

**Untersuchungen zur Pharmakokinetik
von Coffein und Theophyllin
bei Frühgeborenen mit Apnoen**

Hubert Stiegler

1981

AUS DER KINDERPOLIKLINIK DER UNIVERSITÄT

MÜNCHEN

DIREKTOR: PROF. DR. H. SPIESS

Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Coffein
und Theophyllin bei Frühgeborenen mit
Apnoen

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hubert Stiegler

aus München

1980

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Kunze

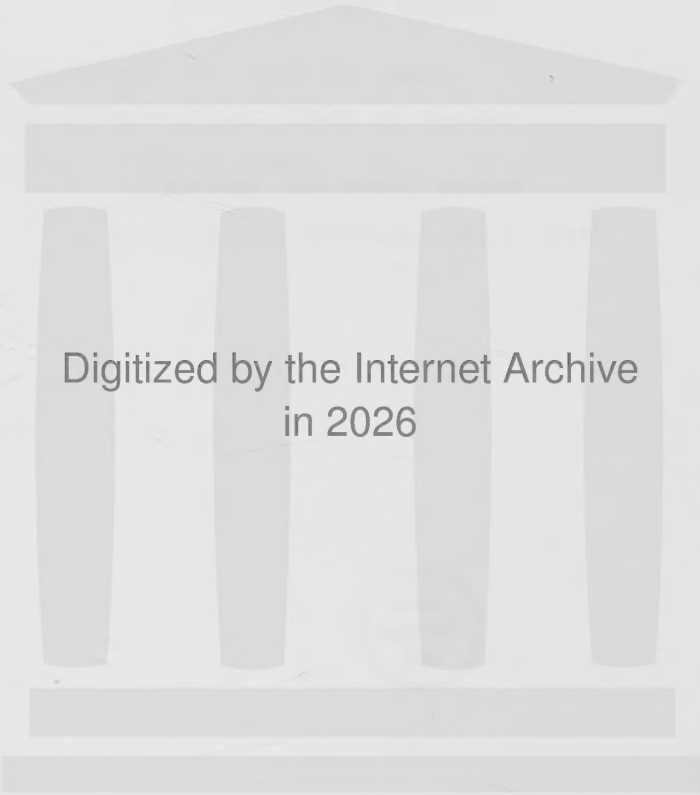
Mitberichterstatter: Prof. H. Spiess

Dekan: Prof. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26. 5. 1981



Meiner lieben Frau gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Coffein und Theophyllin bei Frühgeborenen mit Apnoen

I. Einleitung

1. Allgemeine Pharmakologie der Xanthinderivate

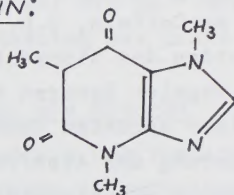
Die drei eng verwandten Xanthinderivate Coffein, Theophyllin und Theobromin sind in den verschiedensten Pflanzen (Kaffee, Tee, Kakao) enthalten und werden weltweit als Genußmittel verwendet.

1.1. Chemische Struktur der Xanthine

Es handelt sich bei den drei Verbindungen um methylierte Xanthine.

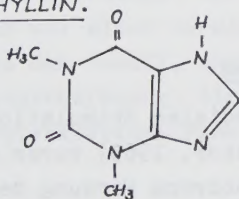
(Abb.1)

COFFEIN:



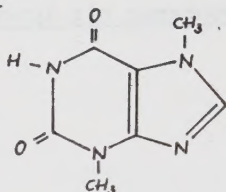
1,3,7 TRIMETHYLYXANTHIN

THEOPHYLLIN:



1,3 DIMETHYLYXANTHIN

THEOBROMIN:



3,7 DIMETHYLYXANTHIN

ABB. 1: CHEMISCHE STRUKTUR DER XANTHINDERIVATE

Dabei ist die Hemmung des Enzyms Phosphordiesterase als wichtigste pharmakologische Wirkung besonders an die Substitution in der 1-3 Stellung gebunden, eine mögliche Erklärung für die quantitativ unterschiedlichen Wirkungen der Xanthinderivate (Beavo et al., 1970). Am Beispiel verschiedener Organe sollen die wesentlichsten Wirkungen erklärt werden.

1.2. Wirkungen auf das ZNS

Die stimulierende Wirkung von Coffein überwiegt hier die beiden anderen Xanthinderivate. Neben der schnell einsetzenden Stimulation des Cortex, was sich in erhöhter intellektueller Leistungsfähigkeit äußert (her-
vorgerufen durch 150 - 250 mg Coffein, d.h. 1 bis 2 Tassen Tee oder Kaffee), werden das Atemzentrum, das Vasomotorenzentrum und die vagalen Zentren erregt. Das Atemzentrum reagiert mit einer erhöhten Sensibilität auf CO₂ und mit einer Steigerung der Atemfrequenz und Atemtiefe, was zu einer Zunahme des Atemminutenvolumens führt.

1.3. Kardiovaskuläres System

Neben einer direkten myokardialen Stimulation durch die Xanthine (Gubareff und Sleator, 1965) wurde ein potenzierender Effekt auf die inotrope Wirkung der β -Adre-

nergika gefunden, erklärbar durch den Anstieg des 3',5' - cyclo-AMP und durch die vermehrte Freisetzung von Katecholaminen aus dem Nebennierenmark unter Xanthinwirkung. Daneben ist noch die Erweiterung der Koronar- und Pulmonalgefäße und der Gefäße von Haut und Niere durch den direkten Angriff der Xanthinderivate zu erwähnen, wodurch ihre zentralstimulierende Wirkung auf das Vasomotorenzentrum teilweise ausgeglichen wird, so daß kein Blutdruckanstieg erfolgen muß. (Kuschinsky, 1976).

In Gegensatz hierzu steht der vasokonstringierende Effekt der Xanthine auf die Gehirngefäße.

1.4. Glatte Muskulatur

Eine sehr bedeutsame Wirkung wird besonders dem Theophyllin zugeschrieben, das über eine Relaxierung der glatten Bronchialmuskulatur eine signifikante Zunahme der Vitalkapazität und Verbesserung des Sekunden-Kapazitätstests bewirkt und somit eines der wichtigsten Medikamente zur Behandlung des Asthma bronchiale ist. Die relaxierende Wirkung auf die glatte Muskulatur wird der Interaktion auf die Ca^{++} -Rückbindung zugeschrieben, die durch den Anstieg des c-AMP beschleunigt wird.

1.5. Einfluß auf die Diurese

Theophyllin, Coffein und Theobromin wird eine schwach diuretische Wirkung zugeschrieben, wobei die Wirkung des Theophyllins überwiegt. Der diuretische Effekt beruht einerseits auf einer verminderten Rückresorption von Natrium aus den Tubuli, andererseits auf einer Zunahme der Markdurchblutung, die zu einer vermehrten Auswaschung des Interstitiums führt.

1.6. Toxikologie

Ritchie (1975) gibt die Letaldosis für Coffein beim Menschen mit 10 g an, eine Dosis, die einen absoluten Extremwert darstellt. Ab einer Dosis von >1g, entsprechend 7-8 Tassen Kaffee wird Ruhelosigkeit, Ideenflucht, gesteigerte Erregbarkeit, die sich bis zum Tremor steigern kann, beobachtet. Tachykardien und Extrasystolen treten gehäuft auf, begleitet von einer beschleunigten Atmung. Zusätzlich kann eine gesteigerte Diurese auftreten. Die Frage nach dem Risiko einer erhöhten myokardialen Infarktrate durch Coffein ist von besonderem Interesse. Jick und Mitarbeiter (1973) berichten, daß ab einem Konsum von mehr als 5 bis 6 Tassen Kaffee täglich das Infarktrisiko verdoppelt wäre. Dieser Aussage widerspricht jedoch die Studie von Klatsky (1973), die keine direkte Abhängigkeit des Infarktrisikos vom Kaffeekonsum fanden. Die Diskrepanz beider Ergebnisse scheint vielmehr in der unterschiedlichen Häufung von Risikofaktoren innerhalb der Gruppen zu suchen zu sein.

Ein mutagener Effekt wird vor allem dem Coffein zugesprochen, jedoch bei Dosen, die weit außerhalb des therapeutischen Bereiches liegen (Thayer et al., 1971).

Die Nebenwirkungen von Theophyllin sind insofern von denen des Coffeins zu unterscheiden, da sie bereits bei einer Serum-Konzentration von 20 µg/ml auftreten und verglichen mit Coffein bedrohlicher sind. So zeigen sich neben Kopfschmerzen, Übelkeit und Unruhe die besonders im Kindesalter gefährlichen Durchfälle mit Erbrechen, zum Teil mit Blut. Ferner wurden Blutdruckabfälle mit Schocksymptomen, Arrhythmien, Hyperthermie und Krämpfe

beobachtet. Folgende Übersicht erlaubt abschließend eine vergleichende Orientierung über die wesentlichsten pharmakologischen Wirkungen der Xanthine:

XANTHINE	ZNS UND ATEMSTI- MULATION	KARDIALE STIMU- LATION	KORO- NARE DILATA- TION	KONSTRIK- TION DER Gehirn- GEFÄßE	ERWEITERUNG DER GLATTEN MUSKULATUR	STIMULA- TION DER SKELETT- MUSKULAT.	DIU- RESE
COFFEIN	1*	3	3	1	3	1	3
THEOPHYLLIN	2	1	1	1	1	2	1
THEOBROMIN	3	2	2	3	2	3	2

* 1 = AM WIRKSAMSTEN

Tab.1. Wirkungen der Xanthine

Die von Richmond 1949 und Powell 1965 nachgewiesene Sensibilisierung des Atemzentrums auf den CO_2 -Antrieb ließen es sinnvoll erscheinen, die Anwendung der Xanthinderivate bei Apnoen von Frühgeborenen zu untersuchen.

2. Wirkung der Xanthinderivate bei Apnoen von Frühgeborenen:

Apnoen werden bei 25% von Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 2500g in den ersten 10 Lebenstagen und bei etwa 84% aller Frühgeborenen unter 1000g in der ersten Lebenswoche beschrieben (Avery und Fletscher, 1974; Daily und Mitarbeiter, 1969).

Apnoen, die primär (idiopathisch) oder sekundär als Symptom einer zu Grunde liegenden Erkrankung auftreten können, sind eine der häufigsten Komplikationen in der Frühgeborenenperiode. Vor allem Apnoen längerer Dauer (z.B. über 15 sec) oder Apnoen mit Bradykardie (unter 100/min.) und/oder Cyanose, können zu schwerer Hypoxie und zu chronischen

neurologischen Ausfällen führen (Bacola et al., 1966). Eine erfolgreiche Apnoetherapie trägt dazu bei, chronisch neurologische Schäden bei Kindern zu verhindern.

Die bisherige Therapie der Apnoe bei Frühgeborenen besteht in der Behandlung der Grundkrankheit (z.B. Sepsis, Atemnotsyndrom, Hypoglykämie) und/oder aus taktiler (cutaner) bzw. vestibulärer Stimulation, Erniedrigung der Umgebungstemperatur auf den unteren neutralen Bereich, sowie in der Applikation von nasalem CPAP (3-4 cm - H₂O) (Kattwinkel, 1977).

Bringen die genannten Maßnahmen keinen Erfolg, so ist eine mechanische Langzeitbeatmung erforderlich, wobei die Gefahr der Infektion, Sepsis oder bronchopulmonalen Dysplasie besteht.

In neuerer Zeit wurde von mehreren Arbeitsgruppen über eine signifikante Abnahme der Apnoefrequenz bei Frühgeborenen nach Applikation von Theophyllin und Coffein berichtet (Kuzemko und Paala, 1973; Shannon et al., 1975; Uauy et al., 1975, Bednarek und Roloff, 1975; Aranda et al., 1977).

In einer Arbeit von Aranda et al. (1977) über die Wirksamkeit von Coffein bei Apnoen von Frühgeborenen zeigte sich eine signifikante Abnahme von $13,5 \pm 2,5$ Apnoen auf $2,1 \pm 0,6$ unter der Anwendung von Coffein, d.h. eine Abnahme von mehr als 50%. Die Atmung kehrte spontan wieder, was auf eine erhöhte Ansprechbarkeit des Atemzentrums gegenüber CO₂ und gegenüber taktilen afferenten Reizen der Umwelt zurückzuführen ist. Richmond (1949) erbrachte den Beweis der erhöhten CO₂-Empfindlichkeit, indem er den Atemantrieb nach alleiniger Coffeingabe und Coffein zusammen mit CO₂ - angereicherter Luft beim Menschen überprüfte.

3% CO_2 in Verbindung mit Coffein steigerten die Sensibilität um 23%, 5% CO_2 mit Coffein um 51,7%.

Während der Atemfrequenzanstieg eine Abnahme des PaCO_2 ergab, wurde die Oxygenierung des Blutes durch den erhöhten Vagotonus, durch die Vitalkapazitätzunahme, durch die Erhöhung der Compliance und durch die Abnahme des pulmonalen Gefäßwiderstandes unter dem Einfluß von Coffein erhöht.

Ähnliche Ergebnisse wurden erzielt bei der Behandlung von Apnoen mit Theophyllin (Davi et al., 1978).

Es ergab sich ebenfalls ein signifikanter Abfall der Apnoen von 55 auf 11/Stunde nach der Behandlung, bedingt durch eine erhöhte CO_2 - Sensibilität des Atemzentrums. Ferner fanden sich eine Zunahme des AMV, ein Abfall von $\text{P}_{\text{alv}} \text{CO}_2$ und $\text{P}_{\text{art.}} \text{CO}_2$ sowie eine Linksverschiebung der CO_2 - Bindungskurve.

Interessanterweise bewirken die Xanthine beim Erwachsenen eine Cheyne - Stokesche Atmung, da hier die Dysregulation der Atmung eng an eine Hyperventilation und eine hohe Sensibilität des Atemzentrums gekoppelt ist - beim Frühgeborenen jedoch an eine Hypoventilation und geringe Sensibilität des Atemzentrums.

Abschließend soll innerhalb der Einleitung eine kurze Übersicht der neonatalen Pharmakologie und Pharmakokinetik gegeben werden.

3. Besonderheiten der Pharmakokinetik beim Früh- und Reifgeborenen

Viele Aspekte der perinatalen Therapie und Toxikologie, die auf der Dosis - Wirkungsbeziehung beruhen, basieren auf der reversiblen Interaktion zwischen Medikament und Gewebsrezeptoren, zwischen dem freien, nicht an Plasma-eiweiße gebundenen Medikament und der Rezeptoraffinität.

Obwohl die Korrelation zwischen biologischer Wirksamkeit und der Plasmakonzentration an ungebundenen Substanzen bei Neugeborenen genauso wie bei Erwachsenen besteht, ergibt sich aus der Tatsache, daß die meisten Abbauewege bei Neugeborenen mehr oder weniger defizient sind, die Notwendigkeit einer genaueren Untersuchung dieser Unterschiede.

Nach der Geburt ändert sich durch die Aufhebung der "materno - fetoplacentaren Einheit" die Pharmakokinetik sprunghaft - das Neugeborene ist erstmals auf eigene Resorption - und Eliminationsvorgänge angewiesen.

Das Ausmaß der Insuffizienz ebenso wie die Reifung der enzymatischen Prozesse sind abhängig: 1. vom Abbaueweg, 2. von der Art des Medikaments, 3. vom postnatalen Alter, 4. vom Gestationsalter und 5. von individuellen Faktoren einschließlich genetischer Aspekte, sowie von spezifischen Krankheiten.

Folgende Übersicht (Abb.2) erlaubt eine Orientierung über die wesentlichsten Abbauewege (Neims et al., 1976).

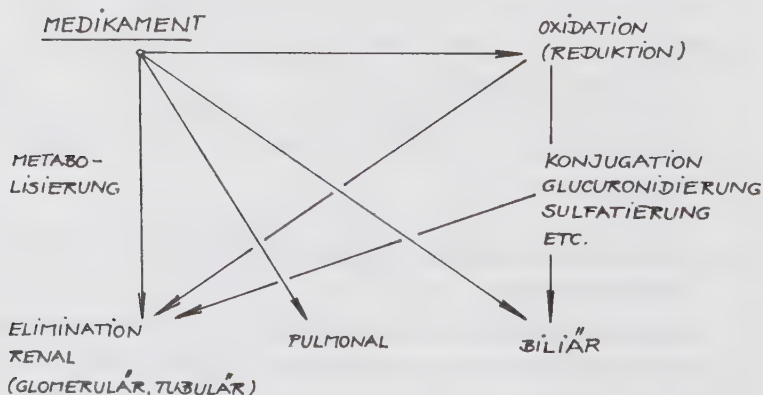


ABB.2: METABOLISIERUNG UND ELIMINATION VON MEDIKAMENTEN

3.1. Plasmaproteinbindung

Da nur der ungebundene Anteil eines Pharmakons auch pharmakodynamisch von Bedeutung ist und dieser wiederum umgekehrt proportional zur Plasmaproteinbindung ist, soll das Verhältnis "Kompartiment Proteinbindung" des Frühgeborenen zum Erwachsenen an Hand der Theophyllinmedikation erläutert werden.

Eine zunehmende Bronchodilatation bei erwachsenen Asthmatikern wurde mit "therapeutischen Theophyllinplasmakonzentrationen" von 5-20 mg/l erreicht, wobei beginnende toxische Wirkungen bei Konzentrationen von 20mg/l angegeben werden. Bei einem Theophyllinplasmaspiegel von 10-20 mg/l ergibt sich mit einer für Erwachsene normalen 56%igen Eiweißbindung ein freier Anteil von 4,4 bis 8,8 mg/l.

Eine therapeutische Konzentration von 4,4 bis 8,8 mg/l freiem Theophyllin entspricht bei einer 36%igen Eiweißbindung bei Frühgeborenen einer Serumgesamtkonzentration von 6,9 bis 13,8 mg/l. (Aranda et al., 1976).

Als Grund für die eingeschränkte Proteinbindung kann eine verringerte Plasmaalbuminkonzentration beim Frühgeborenen (mittlere Plasmaproteinkonzentration: $3,6 \pm 0,4\text{g\%}$) in den ersten Lebenswochen angegeben werden. Dazu kommt eine zusätzliche Belastung des Albumins durch Blutzellmauserung, wobei Bilirubin in Konkurrenz um die Bindungsstellen mit den verschiedensten Medikamenten tritt. Auch wird eine herabgesetzte Bindungsfähigkeit der neonatalen Plasmaproteine diskutiert.

3.2. Halbwertszeit, Clearance und Verteilungsvolumen

Die Frage nach der Toxizität der oben angeführten Vergleichsdosis kann erst unter Berücksichtigung der Halbwertszeit, des Verteilungsvolumens und der Ganzkörperclearance bei Frühgeborenen beantwortet werden.

Dieselbe Erhaltungsdosis, die bei 1 bis 4 Jahre alten Kindern zu therapeutischen Steady-state Serumkonzentrationen von etwa 10 µg/ml Theophyllin führt, würde bei

Frühgeborenen auf Grund der verminderten Clearance eine toxische Serumkonzentration von über 50,ug/ml bedingen, wobei zusätzlich durch die erhöhte freie Fraktion von nicht eiweißgebundenem Theophyllin die Toxizität verstärkt würde.

Nach Aranda et al. (1976) verhalten sich die pharmakokinetischen Parameter bei Frühgeborenen und ein bis vier Jahre alten Kindern wie folgt (Tab.2):

THEOPHYLLIN	FRÜHGEBORENE 3. - 15. TAG	KINDER 1 - 4 JAHRE
HALBWERTZEIT $T_{1/2}$ [h]	30.2	3.4
CLEARANCE [ml/h/kg]	17	100
VERTEILUNGSVOLUMEN [l/kg]	0.69	0.46

Tab.2 Pharmakokinetische Parameter von Theophyllin in Abhängigkeit vom Alter der Probanden (i.v.Applikation).

Die Forderung nach einer Loading - dose bei Frühgeborenen ergibt sich aus der Tatsache des relativ vergrößerten Kompartments "Flüssigkeit" (erhöhtes Verteilungsvolumen), wobei das Verhältnis $\frac{\text{Extrazellular-Raum}}{\text{Intrazellular-Raum}}$

größer ist als beim Erwachsenen. Auch die verlängerte Halbwertszeit beim Frühgeborenen spricht für die Verwendung einer Loading - dose, da vier bis fünf Halbwertszeiten notwendig sind, um Steady-state-Konzentrationen im Plasma zu erreichen.

3.3. Metabolische Elimination

Diese sich mehr auf physikalischer Ebene abspielenden Unterschiede werden begleitet von eingeschränkten metabolischen Eliminationsprozessen wie der:

3.3.1. Oxidation

Hier ist die relative Unreife des oxidativen Enzymsystems in der Leber ebenso wie der Grad seiner Reifung stark von der Art des Medikaments abhängig. Während z.B. für Phenytoin, Phenobarbital, Diazepam und Theophyllin zum Zeitpunkt der Geburt verlängerte Halbwertszeiten gefunden werden, werden durch die allmähliche Reifung der metabolisierenden Enzyme Phenytoin und Phenobarbital rascher erfaßt als die Methylxanthine.

Es konnte gezeigt werden, daß durch die Geburt per se die Reifungsprozesse induziert werden - beim untergewichtigen Frühgeborenen langsamer als beim normalgewichtigen Neugeborenen. Obige Betrachtung bezog sich vor allem auf das hepatische Cytochrom - P 450-System.

3.3.2. Glucuronidierung

Am stärksten eingeschränkt sind die Glucuronidierungsprozesse zum Zeitpunkt der Geburt. Dies wird verständlich, wenn man den stark hydrophilen Charakter der Glucuronidierungsprodukte beachtet, wodurch eine geringe

Plazentargängigkeit bedingt ist. Eine geringe Plazentargängigkeit wäre jedoch in der Fetalzeit nachteilig. Die Bedeutung einer eingeschränkten Glucuronidierung beim Neugeborenen wird besonders an dem durch Chloramphenicol induzierten "Gray-Syndrom" deutlich.

Mit Ausnahme der Sulfatierung, die beim Neugeborenen bereits intakt ist, scheinen auch die Acetylierung und die Konjugation an Aminosäuren zur Zeit der Geburt defizient zu sein.

3.4. Nierenfunktion

Neben diesen zur Halbwertszeitverlängerung und Clearanceerniedrigung beitragenden Prozessen wurde mit der Geburt eine zwei- bis vierfach verlängerte Ganzkörperclearance beobachtet, die mit der eingeschränkten Nierenfunktion von Neugeborenen korreliert. Die Funktionsminderung der Niere basiert zum Teil auf der herabgesetzten glomerulären Filtration, wobei die Basalmembran verdickt ist und nicht alle Glomerula an der Filtration beteiligt sind. So resultiert daraus eine GFR, die nur 30% der Werte für Erwachsene ausmacht. Die zu erwartende Hyperhydratation bleibt unter anderem wegen des unzureichenden Wasser-Konservierungsvermögens der Neugeborenniere aus. Ferner werden das antidiuretische Hormon und das Aldosteron in geringerer Menge produziert.

An Hand des in der Intensivtherapie von Neugeborenen häufig angewandten Antibiotikums Penicillin, das beim Erwachsenen zu 90% renal sezerniert wird, erkannte man an den verlängerten Halbwertszeiten auch eine Unreife des tubulären Systems. Die deutliche Abhängigkeit vom postnatalen Alter ist aus Tabelle 3 ersichtlich.

Renale Penicillin-clearance	Neugeborener 0.-6.Tag	Neugeborener 7.-12.Tag	Neugeborener 14.Tag
T 1/2 (Tage)	3,2	1,7	1,4

Tab.3 Renale Clearance von Penicillin.

Neben dem deutlichen Einfluß des postnatalen Alters auf die tubuläre Sekretion wird eine weitere Abhängigkeit vom Gestationsalter beschrieben, wobei unreife Neugeborene die niedrigste Exkretionsfähigkeit aufweisen. Entsprechend zeigt Methicillin eine dreimal längere Halbwertszeit bei Frühgeborenen im Vergleich zu reifen Neugeborenen. Die Reifung des tubulären Systems wird erst im Laufe von sieben bis acht Monaten vollzogen.

Eine weitere Erklärung der verlängerten Halbwertszeit ergibt sich aus der verminderten renalen Durchblutung. Der mittels der Paraaminohippursäureclearance gemessene renale Plasmafluß ergab bei einem Neugeborenen innerhalb der ersten zwölf Stunden den Wert von 90ml/min. Dieser stieg während der ersten Lebenswoche auf 150 bis 200ml/min an. Die Werte eines Erwachsenen von 600ml/min werden nach ein bis zwei Jahren erreicht.

Von Giacoia und Mitarbeitern (1976) und Aranda und Mitarbeitern (1976, 1977) wurden bei einer kleineren Zahl von Frühgeborenen signifikant verlängerte Halbwertszeiten von Theophyllin und Coffein im Vergleich zum Erwachsenen nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit führten wir weitere Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Theophyllin und Coffein bei Frühgeborenen mit Apnoen durch. Diese Untersuchungen sollen als Grundlage für die klinische Anwendung und adäquate Dosierung der Xanthinderivate bei Apnoen von Frühgeborenen dienen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Serumkonzentrationen nach einmaliger und multipler Xanthinapplikation bei Frühgeborenen mit Apnoen bestimmt und daraus die Halbwertszeit, Clearance und das Verteilungsvolumen errechnet. Weiterhin wurde durch die multiple Bestimmung der Serumkonzentration die Xanthintherapie zur Einhaltung therapeutischer Serumkonzentrationen überwacht. Außerdem wurde die Korrelation der Xanthinkonzentration in Serum und Speichel untersucht. Wir bestimmten außerdem die Ausscheidung von unverändertem Coffein und Theophyllin im Harn und führten Untersuchungen zur Resorption von Coffein und Theophyllin nach oraler Gabe durch. Zusätzlich untersuchten wir, ob Theophyllin bei Frühgeborenen zu Coffein metabolisiert wird.

Voraussetzung für multiple Blutentnahmen bei Frühgeborenen ist die Anwendung einer Mikromethode, die den Xanthinnachweis in kleinsten Volumina biologischer Flüssigkeiten erlaubt. Zur quantitativen Bestimmung der Xanthine verwendeten wir eine Mikromethode (Riechert, 1978), die modifiziert wurde und einen schnellen, genauen und spezifischen Nachweis der Xanthine in 5 - 10 μ l biologischer Flüssigkeit erlaubt.

II. Methode

1. Materialien

Substanzen: Coffein (DAB 7) ⁺
Theophyllin (DAB 7) ⁺
Theobromin (Ph.Eur.II) ⁺

1,7 - Dimethylxanthin	Fluka AG. Buchs/CH
1 - Methylxanthin	Fluka AG. Buchs/CH
3 - Methylxanthin	Fluka AG. Buchs/CH
7 - Methylxanthin	Fluka AG. Buchs/CH

Methanol p.a.	(Merck - Darmstadt)
Äthanol p.a.	(Merck - Darmstadt)
Chloroform p.a.	(Merck - Darmstadt)
Essigsäureäthylester p.a.	(Merck - Darmstadt)
NH ₃ 25%ig p.a.	(Merck - Darmstadt)
Isoamylalkohol p.a.	(Merck - Darmstadt)
Isopropanol p.a.	(Merck - Darmstadt)

- DC - Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄, 20x20cm, 0,25mm Schichtdicke (Merck - Darmstadt).
- Chromatographiekammer (Desaga - Heidelberg).
- Konstriktionspipetten 10,ul (Firma Brand).
- Einmalmikrokapillaren 10,ul (Intrabrand ^(R), Firma Brand)
- UV - Lampe Camag, 254nm.
- Shimadzu Dual Wavelength TLC Scanner CS - 910.
- Zweikanalschreiber (Colora 1200).

+ DAB 7 = Deutsches Arzneibuch, Ausgabe 7; Ph.Eur.II = Pharmacopoea Europea, Band II.

2. Methode der quantitativen Xanthinbestimmung

2.1. Probengewinnung

Blutgewinnung:

Das hierzu verwendete Kapillarblut wurde mittels Fersenpunktion in heparinisierte Astrupröhrchen aufgezogen und in Eppendorf-Hütchen überführt. Um einer Hämolyse vorzubeugen, wurde das Blut sofort nach der Entnahme in einer Eppendorf Ultrazentrifuge 3 Minuten zentrifugiert, abgesert und bei -20°C bis zur Bestimmung aufbewahrt. Je Probe wurden ca. 30 - 40 μl Blut dem Frühgeborenen abgenommen.

Harngewinnung:

Hierfür wurde der 24 bis 72 h-Sammelurin männlicher Frühgeborener in einem Vorklebebeutel (Urofix, Fa. Braun, Messungen) gesammelt. Um die bakterielle Zersetzung des Urins zu verhindern, wurde er mit einigen Tropfen Toluol versetzt und bei -20°C eingefroren.

Speichelgewinnung:

Gleichzeitig mit der Blutentnahme erfolgte die Gewinnung des Speichels. Zur Anregung der Speichelsekretion wurden dem Frühgeborenen einige Tropfen einer 1%igen Ascorbinsäure 30 Minuten vor der Entnahme in den Mund geträufelt. Die Entnahmetechnik ist in Abbildung 3 erläutert.

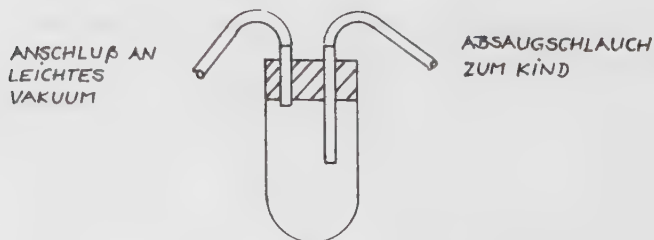


Abb.3. Vorrichtung zur Speichelgewinnung

2.2. Probenauftragung:

Serum und Harn wurden nach dem Auftauen mit einer Einmalmikrokapillare bis zur 10,ul-Marke aufgezogen (Genauigkeit : $\pm$ 1%), der Speichel konnte auf Grund seiner hohen Viskosität nur mit einer Konstriktionspipette (Genauigkeit : $\pm$ 4%) aufgetragen werden. Vor dem Auftragen erfolgte die Markierung der Kieselgelplatte (Abb.4).

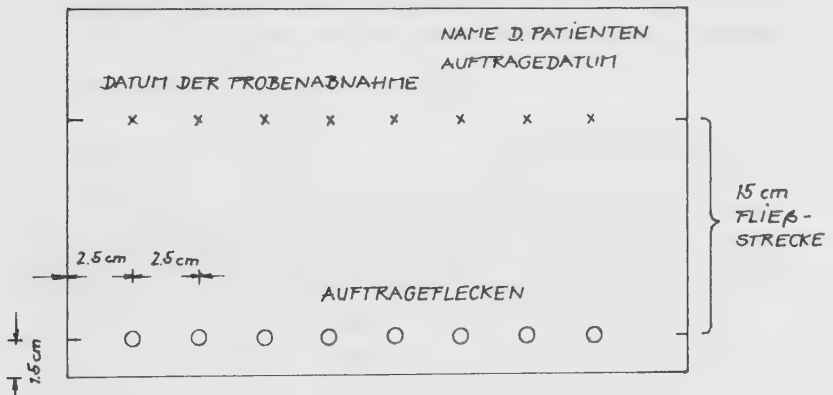


Abb. 4 Markierung der DC-Platte und Auftragen der Proben.

Zunächst erfolgte das fleckenweise Aufbringen von 10,ul Äthanol auf die DC-Platte. Anschließend wurden genau in der Mitte des noch feuchten Alkoholflecks 10,ul Plasma oder Speichel sukzessive aufgetragen, um einen möglichst kleinen Auftragefleck zu erhalten.

Durch den Alkohol wird Serum- und Speichereiweiß am Startpunkt gefällt (Christiansen, 1976), während die Xanthine bei der Chromatographie vollständig aus dem Eiweiß herauswandern. Urin wurde ohne Alkohol direkt aufgetragen.

Auf jede Platte wurden fünf unbekannte Proben von Patienten und ein 100 ng Standard des jeweiligen Xanthins in 10 µl der entsprechenden biologischen Flüssigkeit aufgetragen. Nach dem Auftragen der letzten Probe wurden die Platten 10 - 15 Minuten bei Zimmertemperatur getrocknet, im Falle der Speichelbestimmung mit einem Föhn.

2.3. Chromatographie

Als Fließmittel wurden 100 ml Chloroform -Methanol (90 : 10) verwendet. Für jede Chromatographie ist das Fließmittel neu herzustellen. Chromatographiert wurden jeweils zwei Platten in einer gesättigten, d.h. mit Filterpapier ausgelegten Trogkammer (Firma Desaga, Heidelberg). Bei einer Trennstrecke von 15 cm betrug die Laufzeit 45-50 Minuten. Nach der Chromatographie wurden die Platten bei 100 °C 10 Minuten getrocknet. Zur halbquantitativen Schnellbestimmung (z.B. Erkennen von Intoxikationen) können die Xanthine unter einer UV-Lampe (254nm) ab ca. 50 ng durch ihre Fluoreszenzlösung sichtbar gemacht werden. Anschließend wurden die Xanthine quantitativ spektrodensitometrisch gemessen.

Der mitgelaufene Referenzstandard von 100ng erlaubt einen ersten Konzentrationsvergleich der unbekannten Proben und

gibt einen Anhalt für den Rf-Wert nicht mehr visuell erkennbarer Mengen. Nach der Chromatographie können die DC-Platten für 10 Tage ohne Änderung der Meßergebnisse bis zur densitometrischen Bestimmung in einem Plattenschrank aufbewahrt werden.

Da eine ausreichende Trennung zwischen Theobromin und Theophyllin mit obigem Fließmittel nicht erzielt wurde, muß zur Trennung dieser beiden Xanthine das Fließmittel Äthylacetat - Methanol - 25% Ammoniak (80 : 20 : 10) verwendet werden.

2.4. Eichkurven

a) Stammlösung:

Durch Lösung von je 40 mg Coffein und 40 mg Theophyllin in 100 ml Methanol wurde eine Stammlösung hergestellt. Theobromin wurde in 0,2N NaOH im Verhältnis 1 mg/1 ml gelöst. Diese Stammlösungen wurden bei 4° C für 4 Wochen aufbewahrt.

b) Standard:

Durch entsprechende Verdünnungen der Stammlösung wurden für Theophyllin und Coffein Standards zu 25, 50, 100, 200 und 250 ng in 10 µl Plasma, Speichel und Urin zur Aufstellung von Eichkurven hergestellt. Die Xanthinkonzentration in den jeweiligen Patientenproben wurden mit Hilfe der Eichkurven ermittelt.

2.5. Spektrodensitometrische Messung

Die quantitative Auswertung der DC-Platten erfolgte mit einem Zweiwellenlängendensitometer (CS - 910 Shimadzu, Dual Wavelength TLC - Scanner, Firma Shimadzu, Seisakusho Ltd., Kyoto, Japan) in Reflexion bei einer Referenzwellenlänge von 315 nm und einer Probenwellenlänge von 273 nm. Bei der Messung wurde die Differenz der Reflexion beider Wellenlängen im gleichen Strahlengang durch alternierende Einblendung der Proben - bzw. Referenzwellenlänge registriert. Es wurde die Zick - Zackmethode mit einem Lichtstrahl von $1,25 \times 1,25 \text{ mm}^2$ verwendet bei einem Integrationssetting - range (ISR) von zwei Zentimetern und einer Scan-Geschwindigkeit von 5 mm/min. Dabei mußte der Integrationsnullpunkt vor jedem Fleck mit Hilfe der Hintergrundsuppression neu eingestellt werden. Eine solche Korrektur ist auf Grund unterschiedlicher Plattenleerwerte, die bei "Schwanzbildungen" durch stark hämolytisches Blut, bei Verunreinigungen des Fließmittel oder durch eine unterschiedliche Platenschichtdicke vorkommen können, erforderlich. Auch die spezifische Wahl des Absorptionsmaximums für die Xanthine bei 273 nm schloss eventuelle Störungen durch andere Medikamente aus.

Ferner ergab sich aus den Rf-Werten (= Entfernung des Fließmittel-Xanthinflecks vom Auftragepunkt) eine eindeutige Zuordnung der Xanthine (Coffein: Rf= 44, Theophyllin: Rf= 30).

Die UV-Absorption und das entsprechende Integral wurden gleichzeitig mit einem Zweikanalschreiber (Colora 1200- 01 Lorch, BRD) bei einer Meßverstärkung von 50/50 mV und einer Papiergeschwindigkeit von 1 cm/min gemessen. Jede Probe wurde zweimal gemessen.

2.6. Klinische Durchführung der Versuche

Theophyllin wurde als 0,5%ige wässrige Lösung bei den jeweiligen Frühgeborenen durch eine nasogastrale Sonde appliziert. Coffein wurde als 1%ige wässrige Lösung oder als wässrige Coffeinzitratlösung (20 mg/ml $\approx$ 10 mg/ml Coffein) verabreicht. Diese oralen Gaben erfolgten unabhängig von den jeweiligen Mahlzeiten. Dabei wurden nur Frühgeborene mit Apnoen von 15 sec Dauer (mehr als 2/Stunde) mit oder ohne Bradykardien ($< 100/\text{min}$) und/oder Cyanose, die auf der Intensivstation der Kinderpoliklinik München lagen, mit Coffein oder Theophyllin behandelt.

Normalerweise wurde folgender Therapieplan vorgegeben, der jedoch bei einigen Frühgeborenen hinsichtlich der Dosierung und der Blutentnahmezeiten variiert werden mußte:

Frühgeborene mit Einzeldosis

Theophyllin : 5-6 mg/kg

Coffein : 5-6 mg/kg

Die Blutentnahme erfolgte vor der Theophyllingabe sowie 2h, 4h, 8h, 12h, 18h, 24h und 36h nach der Einzelgabe. Die Coffeinkonzentration wurde vor Gabe und 12h, 24h, 36h, 48h, 60h und 72h nach oraler und i.m. Applikation bestimmt.

Frühgeborene mit Dauertherapie

Theophyllin:

1.) Loading - Dose : 5-6 mg/kg

2.) Erhaltungsdosis: 2-3 mg/kg alle 8-12h.

Die Blutentnahmen erfolgten nach Absetzen der Therapie wie jene nach der Einzelgabe von Theophyllin.

Coffein:

1. Loading-Dose: 5-6 mg/kg.
2. Erhaltungsdosis: 1-1,5 mg/kg alle 24 h.

Nach Absetzen des Medikaments erfolgte die Blutentnahme alle 12h bis zu 120 h.

Die Flüssigkeitszufuhr (Infusionstherapie) wurde vor und während der Behandlung nicht geändert. Gleichzeitig verabreichte Medikamente störten die Xanthinbestimmung nicht.

Es wurden im wesentlichen folgende Medikamente verwendet (Tab.4).

Phenobarbital	
Bisolvon	Zur Infusionstherapie:
Cephalotin	Glucose - Nacl 30 ml
Nystatin	Biseko 10 ml
Gernebcin	Aminosäuren 6 ml

Colistin	Glucose 50%	2ml
Deripen	Ca ⁺⁺	2ml
Atropin	Elektrolyte	0,5ml
Lasix	Liquemin	50 E
Aldactone	Mg ⁺⁺	0,25ml
Decortin		
Ampicillin		

Tab.4. Übersicht der verabreichten Medikamente.

2.7. Statistische Auswertung und pharmakokinetische Daten

Signifikanzen wurden nach dem U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney für den Vergleich zweier unabhängiger Stichproben berechnet. Die kritischen Werte für U wurden aus dem einseitigen Test ($\alpha = 0,01$) entnommen.

Die Berechnung und Auswertung der Eichkurven und der Regressionsgraden erfolgte mit Hilfe des Rechengerätes Algotronic (Firma Diehl), indem das entsprechende Programm gespeichert war. Nach Eingabe der x und y -Werte wurde die Regressionsgerade nach der Formel $y = a + bx$, sowie die Streuung um die Gerade S_{yx} und der Korrelationskoeffizient (r) berechnet.

Die Berechnungen erfolgten nach den Formeln:

$$a = \frac{\sum x^2 \cdot \sum Y - \sum x \cdot \sum xY}{n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$b = \frac{n \cdot \sum xY - \sum x \cdot \sum Y}{n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$\text{Korrelationskoeffizient } r = \frac{n \cdot \sum xY - \sum x \cdot \sum Y}{\sqrt{[n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2][n \cdot \sum Y^2 - (\sum Y)^2]}}$$

$$\text{Streuung der Regressionsgeraden } S_{yx} = \sqrt{\frac{\sum x^2 - (a \cdot \sum Y + b \cdot \sum x \cdot Y)}{n-2}}$$

Die Halbwertszeit ($T_{1/2}$) erhält man mit der Gleichung: $T_{1/2} = \frac{\ln 2}{b}$

Folgende Formeln wurden zur Berechnung der pharmakokinetischen Parameter bei multipler Xanthingabe verwendet (Gioia et al., 1976):

$$\text{Clearance (ml/h/kg)} = \frac{\text{Dosis (mg/kg/h)} \cdot 1000(\text{ml/l})}{C_p^{SS} \text{ (mg/l)}}$$

Die Ableitung der Clearance-Formel ergibt sich aus folgender Überlegung:

Die Invasionsgeschwindigkeit v (mg/kg/h) ist der Konzentration im Fließgleichgewicht (Steady-State) proportional $v = y' \cdot \text{konst.}$

Die Konstante entspricht der totalem Clearance:

$$v = y' \cdot Cl_{\text{tot}} \quad Cl_{\text{tot}} = \frac{v \text{ (mg/kg/h)}}{\text{Steady-State-Konzentration (mg/l)}}$$

C_p^{SS} (Steady-State-Plasmakonzentration) wurde nach mindestens viertägiger Behandlung ($4 \cdot T_{1/2}$) bestimmt.

C_p^{SS} wurde als Mittelwert aus drei bis vier Serumkonzentrationen im Dosierungsintervall oder aus 4-10 Trough-Werten ermittelt.

$$\text{Verteilungsvolumen } v \text{ (l/kg)} = \frac{Cl \text{ (ml/h/kg)} \cdot T_{1/2} \text{ (h)}}{\ln 2 \times 1000 \text{ (ml/l)}}$$

Die Eliminationskonstante b sagt aus, wieviel von einer im Verteilungsvolumen gelösten Substanz pro Zeit umgesetzt wird.

Multipliziert man b mit dem Verteilungsvolumen (ml/sec), so erhält man die Plasmamenge, die pro Zeiteinheit von einer Substanz geklärt wird = Cl_{tot} .

$$\text{dh. } Cl_{tot} = b \cdot v; \quad b = \frac{\ln 2}{T_{1/2}}$$

$$Cl_{tot} = \frac{\ln 2}{T_{1/2}} \cdot v;$$

$$v = \frac{Cl_{tot} \cdot T_{1/2}}{\ln 2}$$

Die Angaben und Berechnung der pharmakokinetischen Parameter erfolgten unter der Annahme einer vollständigen Resorption und Bioverfügbarkeit ($F = 100\%$) der Xanthine bei Frühgeborenen.

Nach einmaliger Applikation der Xanthine wurden die pharmakokinetischen Parameter wie folgt berechnet: $T_{1/2} = \frac{\ln 2}{b}$

$$v \text{ (l/kg)} = \frac{\text{Dosis (mg/kg)}}{C_{p_0}}$$

C_{p_0} ist der Schnittpunkt der Regrressionsgeraden mit der y-Achse.

$$\text{Clearance } (Cl_{tot} \text{ ml/h/kg}) = b \cdot v.$$

Diese pharmakokinetischen Daten wurden unter der Annahme eines Einkompartimentmodells für Theophyllin und in Coffein bei Frühgeborenen erstellt (Loughnan et al., 1976).

Ferner wurden für die Berechnung der Loading- und Erhaltungsdosis folgende Formeln verwendet:

$$\text{Loading-dose} = C_p(x) \cdot v \text{ (l/kg)}$$

x = gewünschte Serumkonzentration (ug/ml)

und

$$\text{Erhaltungsdosis} = C_p^{SS}(y) \cdot Cl_{tot} \text{ (l/kg/Tag)}$$

y = gewünschte Steady-State-Serum-Konzentration (ug/ml).

Die Standardabweichung S und den Variationskoeffizienten VK berechneten wir nach folgenden Formeln:

$$\text{Standardabweichung } S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$\text{Variationskoeffizient } VK = \frac{S}{x} \cdot 100\%$$

III. Ergebnisse

1. Quantitative Bestimmung der Xanthine

1.1. Eichkurven

Für Konzentrationen von 25, 50, 100, 200 und 250 ng Coffein und Theophyllin in 10,ul Serum, Speichel oder Urin ergaben sich folgende Integrale:

Coffein (ng)	10,ul Serum Integral	10,ul Speichel Integral	10,ul Urin Integral
25	4,1	4	4
50	8,0	7,5	7,5
100	18,25	14,5	14
200	31	27,5	27
250	40,8	35,46	34,5

Theophyllin (ng)	10,ul Serum Integral	10,ul Speichel Integral	10,ul Urin Integral
25	3,5	3,5	3,2
50	6,9	7	7
100	14,1	14,5	14,5
200	29	28	28
250	34,4	34,6	34,5

Angegeben ist jeweils der Mittelwert ($\bar{x}$) des Integrals aus 5 bis 7 Einzelwerten. Es ergab sich eine lineare Korrelation zwischen dem Integral und der Xanthinmenge in den einzelnen biologischen Flüssigkeiten. Als Beispiel sollen die Eichkurven für Theophyllin und Coffein im Serum dargestellt werden. (Abb. 5 und 6).

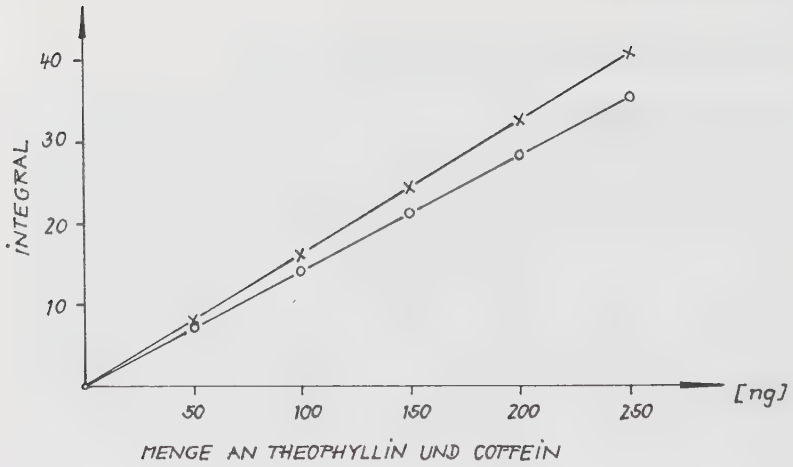


ABB. 5: EICHKURVE FÜR THEOPHYLLIN (o—o) UND COFFEIN (x—x) IM SERUM

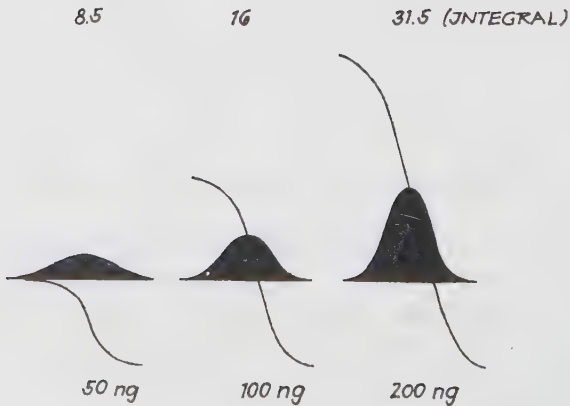


ABB. 6: DARSTELLUNG DER EXTINKTION UND DES INTEGRALS (DENSITOGAMM) VERSCHIEDENER THEOPHYLLIN-MENGEN

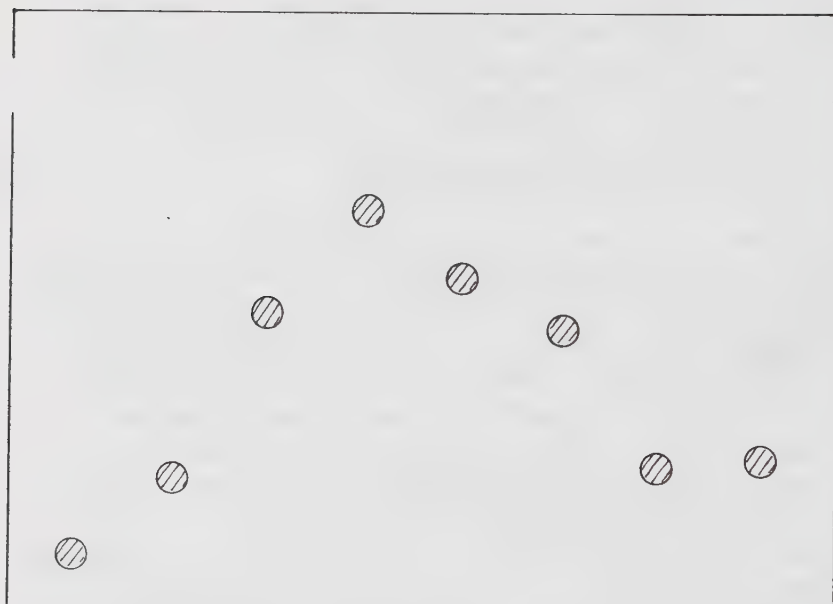
Bei Auftragen von 10, μ l Serum können somit "therapeutische Xanthinkonzentrationen von 6-14, μ g/ml Serum bei apnoischen Frühgeborenen und von 10 - 20, μ g/ml bei Patienten mit Asthma bronchiale bestimmt werden.

1.2. Vorteile dieser Mikromethode

Mit der beschriebenen Mikromethode werden lediglich 5-20, μ l der jeweiligen biologischen Flüssigkeit benötigt, wobei die Xanthine im Nanogrammbereich ohne vorherige Extraktion nach direktem Auftragen der Proben auf die DC-Platten bestimmt werden. Die durch Alkohol bedingte Proteinfällung ermöglicht auf der DC-Platte eine exakte quantitative Bestimmung ohne Einfluß störender Substanzen auf die UV-Absorptionsmessung (Christiansen, 1976). Eine halbquantitative Schnellbestimmung zum Ausschluß einer Intoxikation kann unter Verwendung eines Serumstandards von 100 ng auf Grund der Fluoreszenzlösung der Xanthine innerhalb von 50 - 60 min durchgeführt werden.

1.3. Spezifität der Methode

Hohe Bilirubinkonzentrationen (bis zu 15 mg%), wie sie beim Ikterus neonatorum vorkommen, stören die Xanthinbestimmung nicht. Dasselbe gilt für eine Hämolyse, die bei der Fersenpunktion auftreten kann, da Hämoglobin als Eiweiß durch Alkohol am Auftragepunkt gefällt wird. Eine Störung der Theophyllin- und Coffeinbestimmung durch Metabolite (Methylxanthine) kann auf Grund niedrigerer Rf-Werte der Metaboliten ausgeschlossen werden (Abb.7).



3-METHYL- 1-METHYL- THEO- COFFEIN THEO- 1-7-DI- LEERURIN 7-METHYL-
XANTHIN XANTHIN BROMIN PHYLLIN METHYL- XANTHIN
(BLEIBT AM START- PUNKT

Abb. 7. Trennung der Xanthinderivate (Fließmittel : Chloroform - Methanol 90/10).

Die Rf-Werte für Coffein, Theophyllin und Theobromin verhalten sich wie 44:30:29. Mit dem Fließmittel Chloroform - Methanol (90:10) war somit keine ausreichende Trennung zwischen Theophyllin und Theobromin möglich. Im Hinblick

auf die therapeutische Anwendung von Theophyllin bei Asthmatikern und der Interferenz von Theobromin bei der densitometrischen Bestimmung ergibt sich besonders durch den Genuß von Cacao und Schokolade (Theobrominhaltig) die Notwendigkeit einer eindeutigen Trennung beider Xanthinderivate. Diese ist unter Verwendung des Fließmittels Äthylazetat - Methanol - 25%iger Ammoniak (80:20:10) möglich. Mit dem genannten Fließmittel ergaben sich für Coffein, Theophyllin und Theobromin Rf-Werte von 53, 24 und 43.

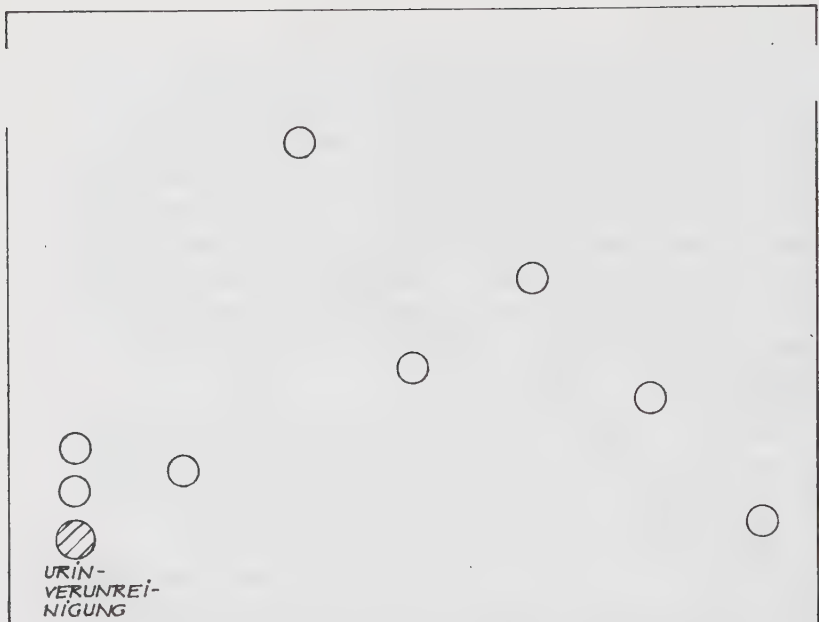
Allgemein lagen die Rf-Werte der Xanthine im Serum etwas unter denen des Speichels und Urins, so daß für die einzelnen biologischen Flüssigkeiten ein entsprechender Referenzstandard aufgetragen werden muß.

Hypoxanthin und Xanthin besitzen auf Grund ihrer hydrophilen Eigenschaften deutlich niedrigere Rf-Werte als die Methylxanthine und stören die Messung nicht.

Wie bereits erwähnt, ergab sich außerdem keine Störung der Xanthinbestimmung durch die in Tabelle 4 aufgeführten Medikamente.

1.4. Trennung der Xanthinmethaboliten aus dem Urin.

Für einen quantitativen Nachweis der Xanthinmetabolite ist die Anwendung eines neuen Fließmittels erforderlich. Aus der Vielfalt von Trennungsversuchen erwies sich das Fließmittel Äthylazetat - Isoamylalkohol - Isopropanol - 25%iger Ammoniak - Aqua dest. (24:32:32:12:4) am geeignetsten. Bei einer Laufzeit von 2h ergab sich folgende Trennung (Abb.8).



3-METHYL- 1-METHYL- COFFEIN THEO- THEO- 3-METHYL- 7-METHYL-
 1-METHYL- XANTHIN XANTHIN PHYLLO- BROMIN XANTHIN XANTHIN
 XANTHIN,
 LEURURIN

Abb.8. Trennung der Xanthinmetabolite (erste Auftrennungsreihe erfolgte aus dem Urin). Detektion durch Fluoreszenzlösung auf Kieselgel 60 F 254 Platten.

1.5. Empfindlichkeit der Mikromethode

Für Xanthinkonzentrationen über 10, µg/ml sind 5, µl der jeweiligen biologischen Flüssigkeiten für eine quantitative Bestimmung ausreichend. Durch die Änderung der Scan-Geschwindigkeit können noch Konzentrationen von 1, µg/ml bestimmt werden.

Der Variationskoeffizient betrug für 10 und 20,ug Theophyllin/ml Serum bei der Messung auf verschiedenen Platten 2% (n= je 10).

Dieselben Untersuchungen für Serum-Coffeinkonzentrationen von 10 und 20,ug/ml ergaben einen Variationskoeffizienten von 3% (n= je 10).

Für 10,ug Coffein und Theophyllin in 1 ml Speichel oder Urin wurde ein Variationskoeffizient von 2-3% (n= je 10) gefunden.

2. Pharmakokinetik der Xanthine

2.1. Theophyllin

Bei 12 Frühgeborenen bestimmten wir die Theophyllinhalbwertszeit, während bei 11 Frühgeborenen zusätzlich die Clearance und das Verteilungsvolumen berechnet wurden. Die pharmakokinetischen Parameter wurden bei 11 Frühgeborenen nach Erreichen von Steady-state-Plasmakonzentrationen (multiple Gabe) und bei einem Probanden nach einer oralen Einzelgabe ermittelt. Die pharmakokinetischen Daten wurden für zwei Gruppen von Frühgeborenen angegeben, die nach dem postnatalen Alter in Gruppe I (6 Frühgeborene : 1. bis 9. Lebenstag) und Gruppe II (6 Frühgeborene : 10. bis 36. Lebenstag) getrennt wurden. Für jede einzelne Gruppe errechneten wir die Halbwertszeit, das Verteilungsvolumen und die totale Clearance (Tab. 5 und 6) und gaben die Mittelwerte ($\bar{x}$) der einzelnen Parameter an.

Tabelle 5: Pharmakokinetik von Theophyllin in Abhängigkeit vom postnatalem Alter.

Gruppe I: 1. bis 9. Lebenstag. S = Standardabweichungen

Kind	Gestation Wochen	Geb.Gew. (Gramm)	Alter bei letzter Dosis (Tage)	letzte Dosis (mg/kg/24h)	Cp ^{SS} (µg/ml)	T 1/2 (h)	Cl _{tot} (ml/h/kg)	V (l/kg)
A,	32	1450	8	4 x 2 mg	14,5	23,6	23	0,78
G	34	2000	6	4 x 2 mg	10,6	23,6	31,1	1,06
Sch	34	1970	5	3 x 2,3 mg	11,27	24,6	25,1	0,89
C	34	2100	6	2 x 2 mg	8,3	24,9	20,1	0,72
D	36	2600	7	2 x 3 mg	11,5	30,3	21,7	0,95
Gn	30	1100	9	2 x 2,5 mg	7,9	20,1	26,60	0,77
$\bar{x} = 33,3$		$\bar{x} = 1870$	$\bar{x} = 6,8$	$\bar{x} = 5.9 \text{ mg}$	$\bar{x} = 10,7$	$\bar{x} = 24,5$	$\bar{x} = 24,6^+$	$\bar{x} = 0,86$
S = 2,1		S = 525,7	S = 1,5		S = 2,4	S = 3,3	S = 3,9	S = 0,13

+ Signifikant ($p < 0.01$) mit dem Stuart-Whitney Test.

Tabelle 6: Pharmakokinetik von Theophyllin in Abhängigkeit vom postnatalen Alter
Gruppe II: 10. bis 36. Lebenstag

Kind	Gestation (Wochen)	Geb. Gew. (Gramm)	Alter bei letzter Dosis (Tage)	letzte Dosis (mg/kg/24h)	Cp ^{SS} (µg/ml)	T 1/2 (h)	Cl _{tot} (ml/h/kg)	V (L/kg)
K	32	1550	10	1 x 3,0 mg (Finzelgabe)		15,5		
L	29	1500	18	2 x 1,8 mg	3,92	19,5	37,5	1,06
Br	30	1600	13	2 x 2 mg	5,24	20,4	32	0,94
Kar	29	1050	36	2 x 2,6 mg	5,15	20,8	40,5	1,21
Bakt	30	1400	26	3 x 1,5 mg	5,2	16,3	36,1	0,85
A ₂	32	1450	24	2 x 2 mg	6,1	21,3	41	1,26
	$\bar{x}$ 30,3 S= 1,37	$\bar{x}$ 1425 S=1968	$\bar{x}$ 21.1 S= 9,5	$\bar{x}$ 4,05	$\bar{x}$ 5.12 S=0,78	$\bar{x}$ 18,97 S=2,46	$\bar{x}$ 37,4 S=3,65	$\bar{x}$ 1,06 S=0,17

Cp^{SS} = (Steady-state Plasmakonzentration) = Mittelwert aus 3-5 Plasmakonzentrationen im Dosierungsintervall.

T 1/2 = Halbwertszeit

Cl_{tot} = Totale Clearance

V = Verteilungsvolumen

2.1.1. Einfluß des postnatalen Alters auf die Halbwertszeit.

Es ergab sich eine signifikant kürzere Theophyllinhalbwertszeit (18,97 h) bzw. signifikant höhere totale Clearance (37,4 ml/h/kg) ($P < 0,01$) bei Frühgeborenen mit einem postnatalen Alter von 10-36 Tagen (Gruppe II) im Vergleich zu einer mittleren Halbwertszeit von 24,5 h bzw. totalen Clearance von 24,6 (ml/h/kg) bei Frühgeborenen mit einem postnatalen Alter von 5-9 Tagen (Gruppe I).

Dieses Ergebnis spricht dafür, daß eine Reifung der xanthinmetabolisierenden Leberenzyme innerhalb der ersten 3-4 Lebenswochen stattfindet, so daß daraus eine kürzere Halbwertszeit für Theophyllin resultiert.

Das mittlere Gestationsalter der innerhalb der ersten Lebenstage behandelten Frühgeborenen betrug 33,3 Schwangerschaftswochen (SSWo), während die älteren Frühgeborenen (10-36 Tag) ein mittleres Gestationsalter von 30,3 SSWo aufwiesen.

Die kürzere Halbwertszeit der zweiten Gruppe dürfte in erster Linie durch das höhere postnatale Alter dieser Gruppe zu erklären sein. Da die Frühgeborenen der Gruppe II ein niedrigeres Gestationsalter als die Frühgeborenen der Gruppe I aufwiesen und bei Geburt somit unreifer waren, dürfte ein Einfluß des Gestationsalters auf die Leberenzymreifung und somit kürzere Halbwertszeit unserer Probanden keine signifikante Rolle spielen. Der Einfluß des Gestationsalters auf die Enzymreifung müßte durch Untersuchungen zur Theophyllinhalbwertszeit bei niedrigerem Gestationsalter (z.B. 30.SSWo) im Vergleich zu gleichaltrigen Frühgeborenen mit einem höheren Gestationsalter (z.B. : 36 SSWo) nachgewiesen werden.

Unsere Ergebnisse bezüglich des Einflusses des postnatalen Alters auf die Halbwertszeit und Clearance von Theophyllin bei Frühgeborenen werden durch die Arbeiten von Aranda et al., 1976 und Giacoia et al., 1976 unterstützt (Tab.7). Dabei entsprechen die Frühgeborenen von Aranda bezüglich des postnatalen Alters ($\bar{x}$ = 7,5 Tage) unserer ersten Gruppe ($\bar{x}$ = 6, 8 Tage) und die Frühgeborenen von Giacoia ($\bar{x}$ = 41 Tage) eher unserer Gruppe II ($\bar{x}$ = 21,1 Tage).

Gruppe	Gestation (Wochen)	Alter (Tage)	n	Cl _{tot} (mg/kg/h)	T 1/2 (h)
Frühgeborene Gruppe I (eigene Untersuchung)	33,3 ⁺	6,8 (5-9)	6	24,6 (20,1-31,1)	24,5 (20,1-30,3)
Frühgeborene Aranada et al., Aminophyllin i.v.	27,5	7,5 (3-15)	6	17,6 (12,1-25,9)	30,2 (14,4-57,7)
Frühgeborene Gruppe II (eigene Untersuchung)	30,3	21,1 (10-36)	6	37,4 (32-40,5)	18,97 (15,5-21,3)
Frühgeborene Giacoia et al., Theophyllin oral	28,3	41 (25-57)	8	39 (22,6-68,3)	19,9 (15-29)

+ Angegeben ist jeweils $\bar{x}$ (range).

Tab.7 Pharmakokinetik von Theophyllin bei Frühgeborenen in Abhängigkeit vom postnatalen Alter.

Die durchschnittlichen pharmakokinetischen Daten von 26 Frühgeborenen sind in Tabelle 8 dargestellt.

Anzahl der Frühgeborenen	Gestation (SWo)	Alter (Tage)	C_{tot} (mg/kg/h)	T 1/2 (h)
26	29,9	19,1	29,7	23,4

Tabelle 8. Pharmakokinetik von Theophyllin innerhalb der ersten zwei Lebensmonate (3. - 57. Tag).

Als Richtlinie für die therapeutische Anwendung und Dosierung von Theophyllin bei Frühgeborenen ist somit eine durchschnittliche Halbwertszeit von 24 Stunden zu berücksichtigen.

Die Halbwertszeit bei Frühgeborenen ist somit im Vergleich zu Kindern und Erwachsenen signifikant verlängert, während die Clearance signifikant erniedrigt ist (Tab.9).

Anzahl der Kinder bzw. Erwachsenen	Alter	T 1/2 (h)	Cl _{tot} (ml/kg/h)
26 Frühgeborene	⁺ 19,1 Tage (3.-57.Tag)	23,4 (14,4-57,7)	29,7 (12,1-68,3)
10 Kinder (Loughnan et al., 1976)	1-4 Jahre	3,4	100
19 Erwachsene (Loughnan et al., 1976)	23-79 Jahre	6,7	66

⁺ angegeben ist jeweils $\bar{x}$

Tab.9. Pharmakokinetik von Theophyllin bei Frühgeborenen Kindern und Erwachsenen

PATIENT	$T^{1/2}$ h	ke h^{-1}	Cl mg/h/kg
A	23.6	0.029	23
G	23.6	0.029	30
K	15.5	0.0445	
L	19.5	0.0352	37.5

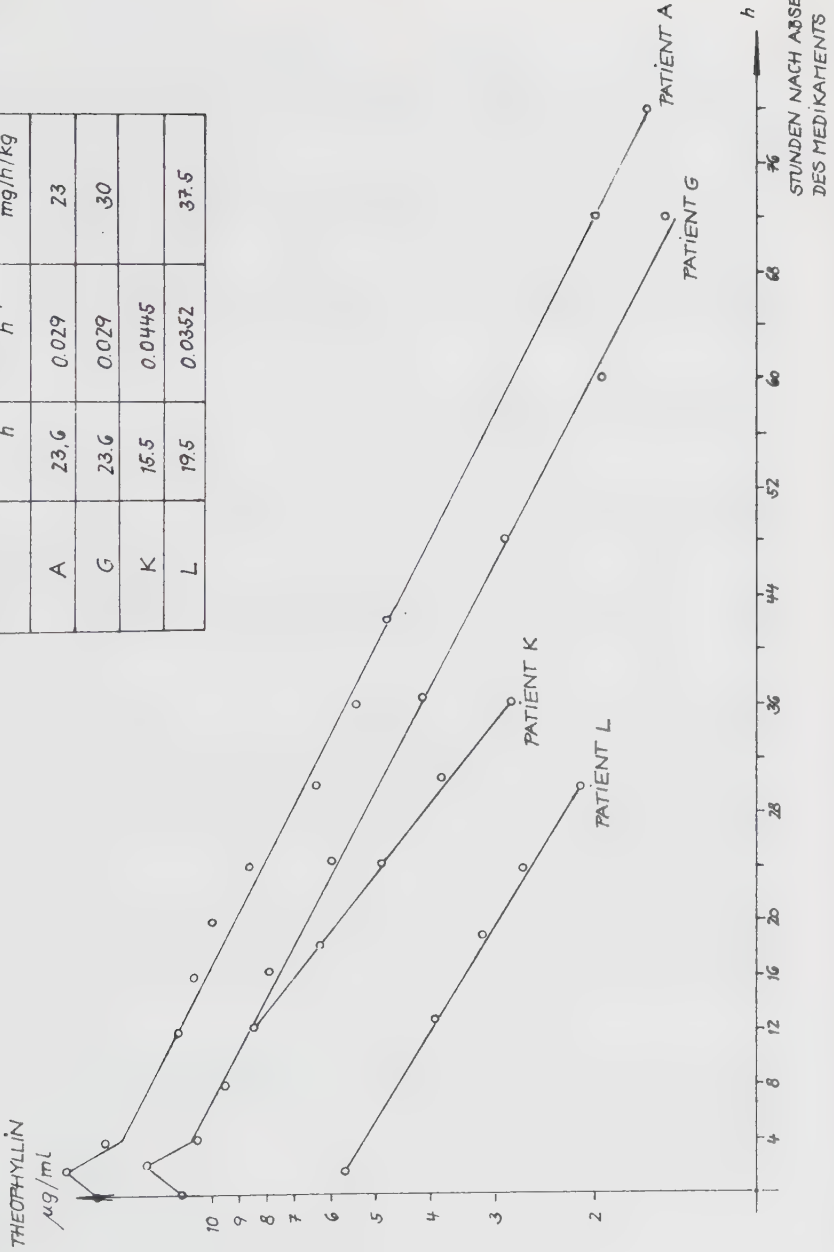


ABB. 9: HALBLOGARITHMISCHE DARSTELLUNG DER ELIMINATION VON THEOPHYLLIN BEI FRÜHGEBORENIEN

In Abb.9 ist die Elimination von Theophyllin aus dem Serum bei 4 Frühgeborenen dargestellt. Ausgehend von der Annahme, daß durch ein großes Verteilungsvolumen (ECR/ICR > als beim Erwachsenen) die Pharmakokinetik des Frühgeborenen einer Gleichung 1.Ordnung folgt, erhält man nach der Gleichung $Y = Y_0 \cdot e^{-k \cdot t}$ im halblogarithmischen Raster eine Gerade (Regressionsgerade) mit der Eliminationskonstanten k als Steigung der Geraden (Abb.9).

2.1.2. Verteilungsvolumen.

Obgleich das Kompartiment "Proteinbindung" beim Frühgeborenen kleiner ist als beim Erwachsenen und somit eine höhere renale Extraktion eine kürzere Halbwertszeit bedingen sollte, resultiert aus einer renalen Unreife, einer insuffizienten Leberenzymaktivität und einem vergrößerten Flüssigkeitskompartiment die lange Halbwertszeit bei Frühgeborenen.

Das größere Flüssigkeitskompartiment bei Frühgeborenen im Vergleich zu Erwachsenen bedingt ein größeres Verteilungsvolumen, wenn bei gegebener Dosis D und erhaltener Stoffkonzentration nach Durchmischung Y das Verteilungsvolumen $= \frac{D}{Y}$ ist.

Entsprechend ist nach unseren Ergebnissen das durchschnittliche Theophyllinverteilungsvolumen für Frühgeborene mit 0,92 (l/kg) im Vergleich zu Erwachsenen mit einem Verteilungsvolumen von 0,3 - 0,5 (l/kg) erhöht.

Auf therapeutische Konsequenzen, bedingt durch das höhere Verteilungsvolumen, wird in der Diskussion eingegangen.

2.1.3. Resorption

Die Resorption von Theophyllin wurde nach oraler Applikation einer 0,5%igen wässrigen Theophyllinlösung untersucht (Tab.10).

Kind	Dosis (mg/kg)	Plasmakonzentrationen in $\mu\text{g/ml}$ nach:						
		0h	1h	2h	3h	4h	8h	12h
C	5			7,7		8,1	7,1	6,1
N	4,9		5,9	6,8		5,7	4,9	
L	5,3		4,1	6,4	6,4			
G	5,4			7,1		7,0	5,4	
A	2,0	15,5		18,5		15,5		

Tab. 10. Resorption von Theophyllin nach oraler Applikation.

Bei 4 Patienten wurden maximale Serumkonzentrationen zwei Stunden nach oraler Applikation, bei einem Patient (C) 4 Stunden nach Theophyllingabe erreicht.

In Abb.10 sind die Resorptionskurven von 2 Frühgeborenen dargestellt.

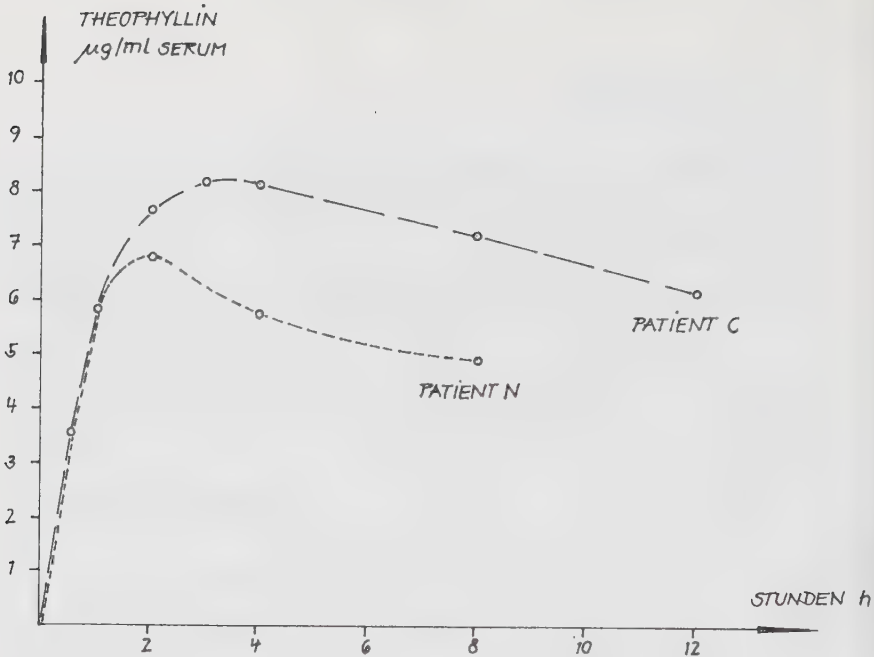


ABB. 10: RESORPTIONSKURVEN VON THEOPHYLLIN
PATIENT C UND N AUS TAB. 10

Rektale Applikation

Ein Frühgeborenes wurde achtstündlich mit 7 Gaben von je 3,13 mg/kg Theophyllin in Form von Suppositorien behandelt. Abb. 11 zeigt eine zunehmende Kumulation von Theophyllin, die auf einer verzögerten biologischen Verfügbarkeit des Xanthinderivats bei rektaler Applikation basiert. Entsprechend ist für eine therapeutische Anwendung von Suppositorien ein verlängertes Dosierungsintervall (z.B. 12h) zu fordern.

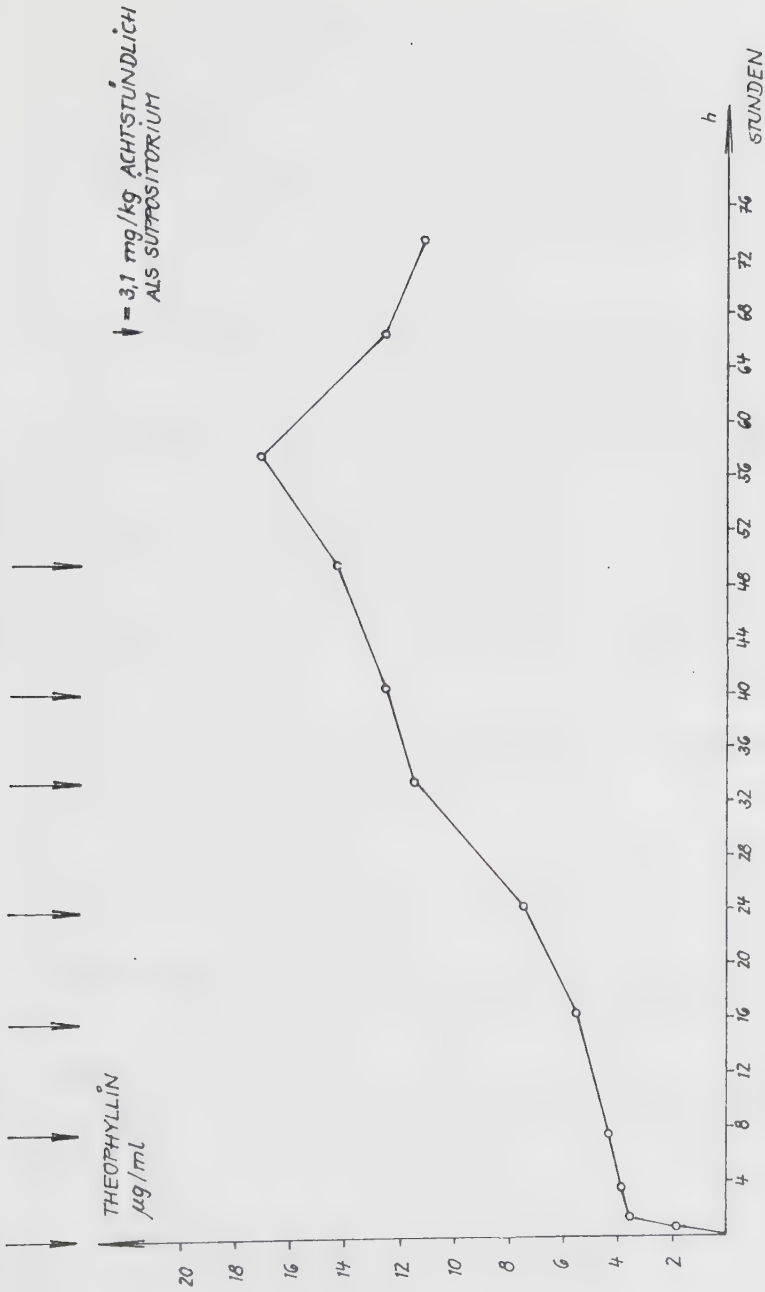


ABB. 11: SERUMSPIEGEL VON THEOPHYLLIN NACH RESORPTION AUS SUPPOSITORIEN

2.1.4. Überwachung der Serumkonzentrationen

Eine multiple Xanthinapplikation bei Frühgeborenen, wie sie bei länger dauernden Apnoen indiziert ist, erfordert wegen der Gefahr einer Kumulation eine Überwachung der Serumspiegel. Durch die hier beschriebene Mikromethode lassen sich Serumverlaufskontrollen, wie sie Abb.12 und 13 zeigen, während einer Langzeittherapie von Frühgeborenen mit Apnoen durchführen.

2.1.5. Bestimmung der Theophyllinkonzentration im Speichel

Bei drei Frühgeborenen wurde gleichzeitig mit der Blutentnahme Speichel abgesaugt und darin die Theophyllinkonzentration bestimmt. Die Untersuchung umfaßte 17 Einzelproben (Tab.11) und ergab einen Speichel/Plasmaquotienten ($\mu\text{g/ml}$ / $\mu\text{g/ml}$) von 0,73. In früheren Untersuchungen (Riechert et al., 1980) wurde für Theophyllin bei Frühgeborenen eine freie, nicht an Serumeiweiß gebundene Fraktion (α) von 72,6% gefunden. Die Speichelskonzentration von Theophyllin entspricht damit der freien, nicht an Serumeiweiß gebundenen Theophyllinkonzentration (Tab.11).

	Speichel/Plasma-Quotient	α (%)
$\bar{x}$	0,73	72,6
SD	0,04	1,8
VK	5,2% (n=17)	

Tab.11 Korrelation zwischen der "freien" Plasmakonzentration und Speichelskonzentration von Theophyllin.

Die Konzentration von Theophyllin im Speichel bei einem Frühgeborenen ist in Abb.14 dargestellt.

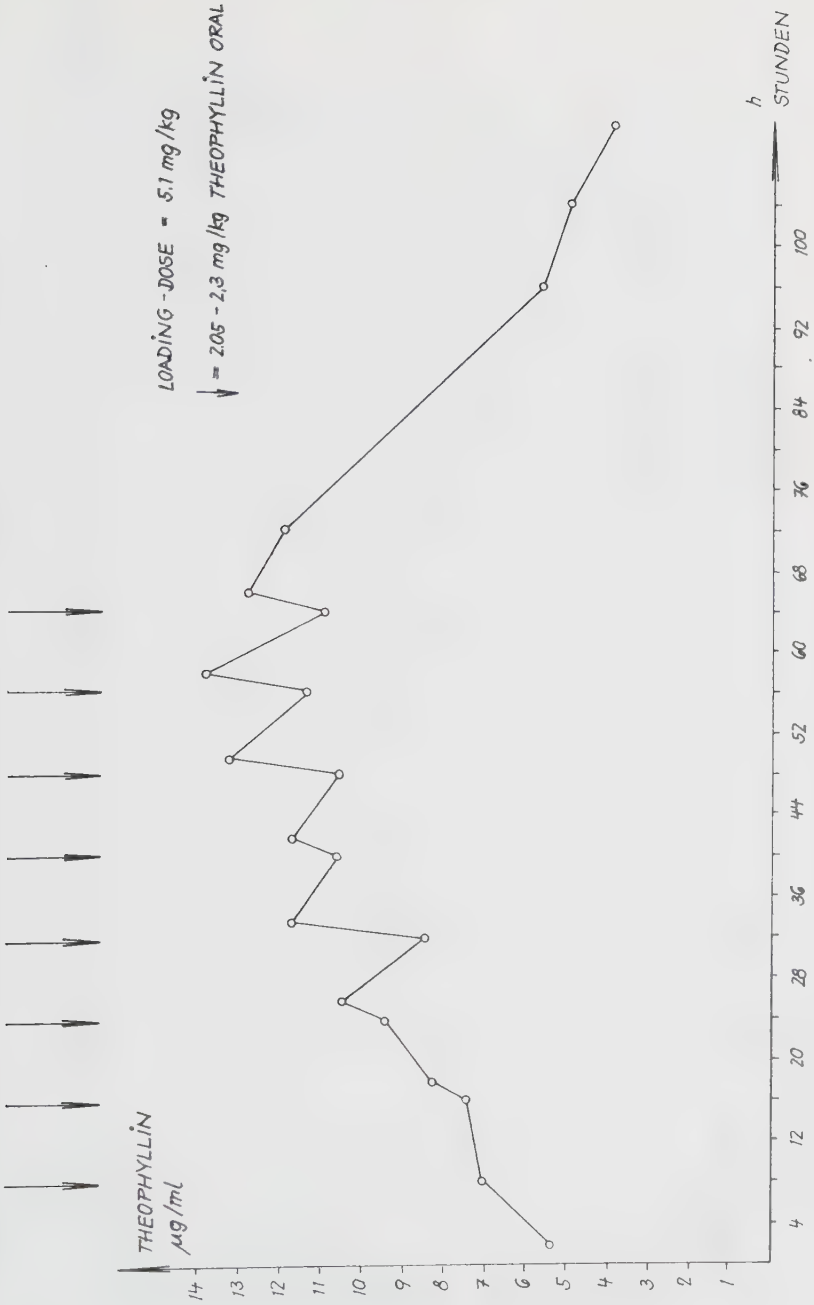


ABB. 12: SERUMKONTROLLKURVE BEI MULTIPLER GABE VON THEOPHYLLIN (KIND S)

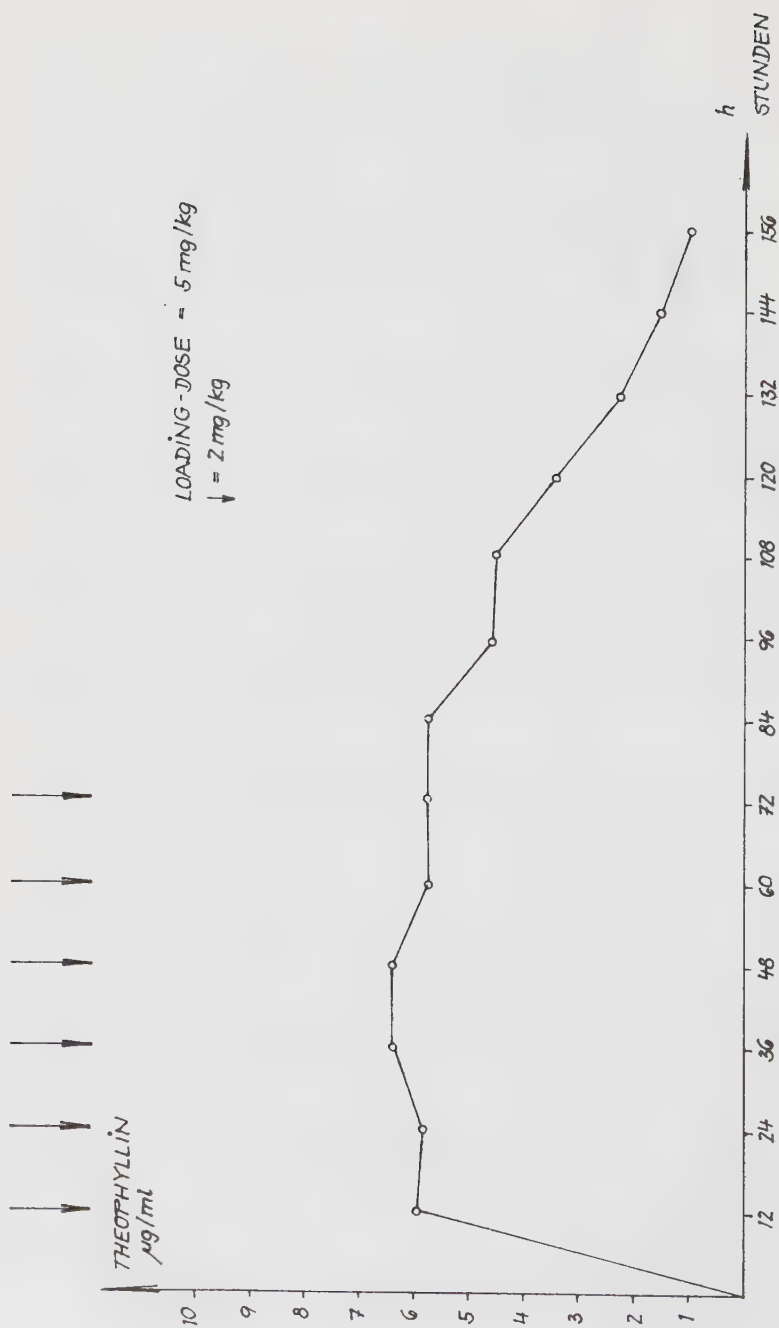


ABB. 13: SERUMKONTROLLKURVE BEI MULTIPLER GABE VON THEOPHYLLIN (KIND 3)

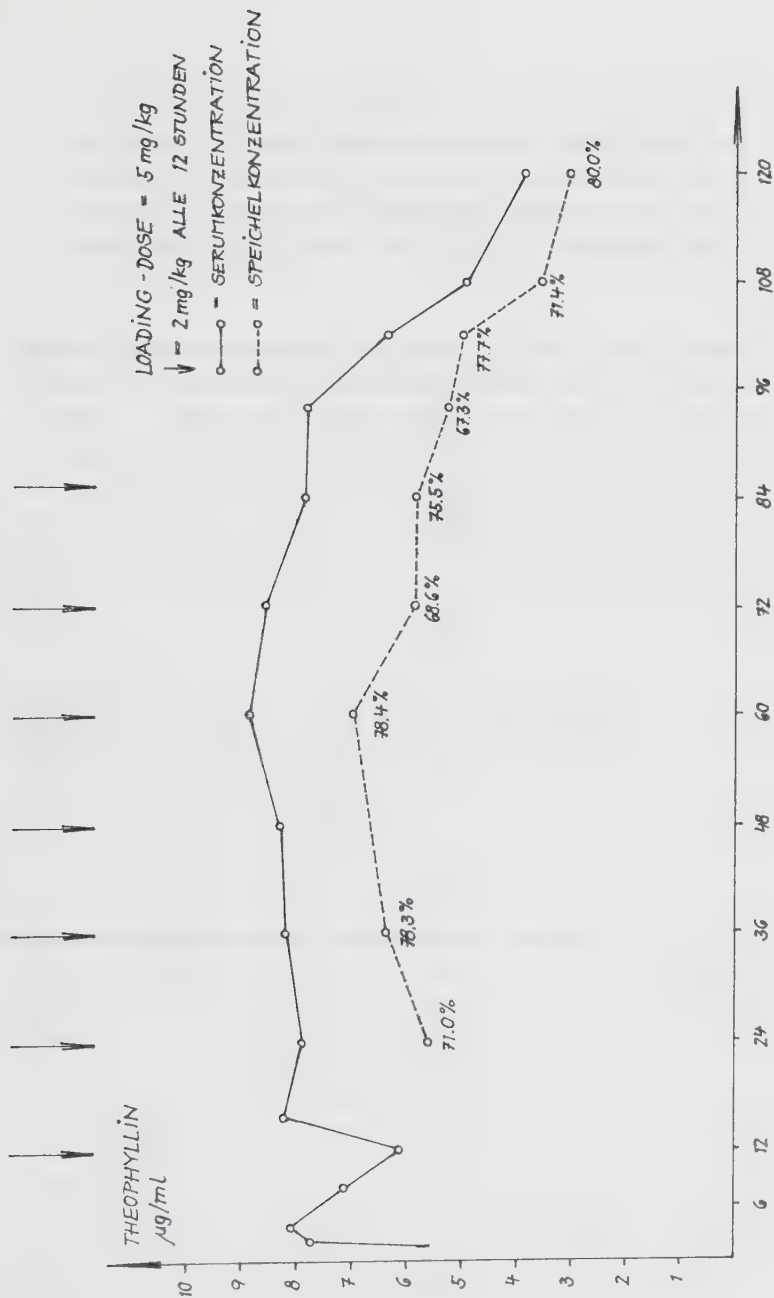


ABB. 14: KONZENTRATION VON THEOPHYLLIN IM SPEICHEL
 DIE ZAHLEN GEBEN DEN SPEICHEL/SERUMKONZENTRATIONSQUOTIENTEN IN % AN.

2.1.6. Ausscheidung von unverändertem Theophyllin im Urin

Falls die signifikant längere Halbwertszeit von Theophyllin bei Frühgeborenen im Vergleich zu Erwachsenen auch durch unreife metabolisierende Leberenzyme bedingt ist, müßte im Urin von Frühgeborenen eine signifikant höhere Ausscheidung von unverändertem Theophyllin vorliegen als bei Erwachsenen.

Nach Erreichen von Steady-State-Plasmakonzentrationen wurde bei zwei Frühgeborenen die Ausscheidung von unverändertem Theophyllin im 24-Stundenurin untersucht (Tab.12).

30-35 % der 24-Stundentheophyllindosis wurden nach Erreichen von Steady-State-Konzentrationen unverändert im 24-Stundenurin ausgeschieden. Damit fanden wir eine signifikant erhöhte Theophyllinausscheidung bei Frühgeborenen gegenüber Erwachsenen mit 6 - 12 % (Jenne et al., 1976).

Kind	Gestation	24-h-Dosis (mg) im Steady-State	% Theophyllin der Tagesdosis im 24-Stunden- urin	% Theophyllin im Erwachse- nen-Urin
Sch	34	13,3	31,5	6-12
D	35	14,5	35,5	6-12

Tab.12 Ausscheidung von unverändertem Theophyllin im Urin

2.2. Coffein

In den beiden bisher durchgeführten Arbeiten über die Behandlung von apnoischen Frühgeborenen mit Coffein wurden lediglich Angaben über eine verlängerte Halbwertszeit von Coffein (40 bis 231h; $\bar{x} = 97,5h$) gegenüber Erwachsenen gemacht ($T_{\frac{1}{2}} = 3-5 h$) (Aranda et al., 1977).

Wir untersuchten deshalb erstmals an 6 Frühgeborenen mit Apnoen die verschiedenen Parameter wie: Halbwertszeit, Clearance und Verteilungsvolumen (Tab. 13, Abb.15).

Dabei fanden wir nach oraler bzw. intramuskulärer Applikation eine mittlere Halbwertszeit von 70,6 h (53,2 - 84,5 h). Dies bestätigt die Angaben von Aranda über eine extrem verlängerte Halbwertszeit von Coffein gegenüber Erwachsenen ($T_{\frac{1}{2}} = 3-5 h$).

Für die totale Clearance erhielten wir einen mittleren Wert von 8,6 ml/kg/h (5,4 - 14).

Das mittlere Verteilungsvolumen betrug 0,84 (l/kg) (0,57 - 1,08).

Drei Frühgeborene wurden unter fehlender Kenntnis der langen Halbwertszeit von Coffein mit hohen Erhaltungsdosen von $3 \times 4,9 \text{ mg/kg/Tag}$ behandelt, so daß unter kontinuierlicher Kumulation maximale Serumkonzentrationen von $42 \mu\text{g/ml}$ erreicht wurden ohne Einstellung von Steady-state-Plasmakonzentrationen. Bei diesen Kindern berechneten wir nach Absetzen der Xanthintherapie nur die Halbwertszeit.

Kind	Gestationsalter (Wochen)	Geburtsgewicht (Gramm)	Alter bei letzter Dosis (Tage)	Einzelosis (μ g/kg)	T 1/2 β (h)	Cl (mg/h/kg)	V_D (l/kg)
R	33	1600	1	5.9 i.m.	78.8	8.8	1.0
Kl2	34	1280	24	9.1 oral	73.7	5.4	0.57
Pl	34	2270	7	10.0 oral	84.5	6.6	0.80
S	35	2100	8	7.0 oral	79.7	6.8	0.78
Kr	33	1710	8	6.0 oral	53.9	10.2	0.80
H	31	1460	7	2x1.3/Tag ⁺	53.2	14.0	1.08
	33.3	1737	9.2	-	70.6	8.6	0.84
				mg/kg/Tag			
Sch	31	1550	9	3x4.4 ⁺	182.4		
Kl1	34	1280	11	3x5.5 ⁺	113.6		
V	31	1160	13	3x5.4 ⁺	76.2		
	32	1330	11	14.8	124.1		

Tägliche Dosis

b. 13 Pharmakokinetik von Coffein bei Frühgeborenen.

	$T^{1/2}$	k_e
A: THEOPHYLLIN	23,6	$0,0294 \text{ h}^{-1}$
S: COFFEIN	79,7	$0,0087 \text{ h}^{-1}$

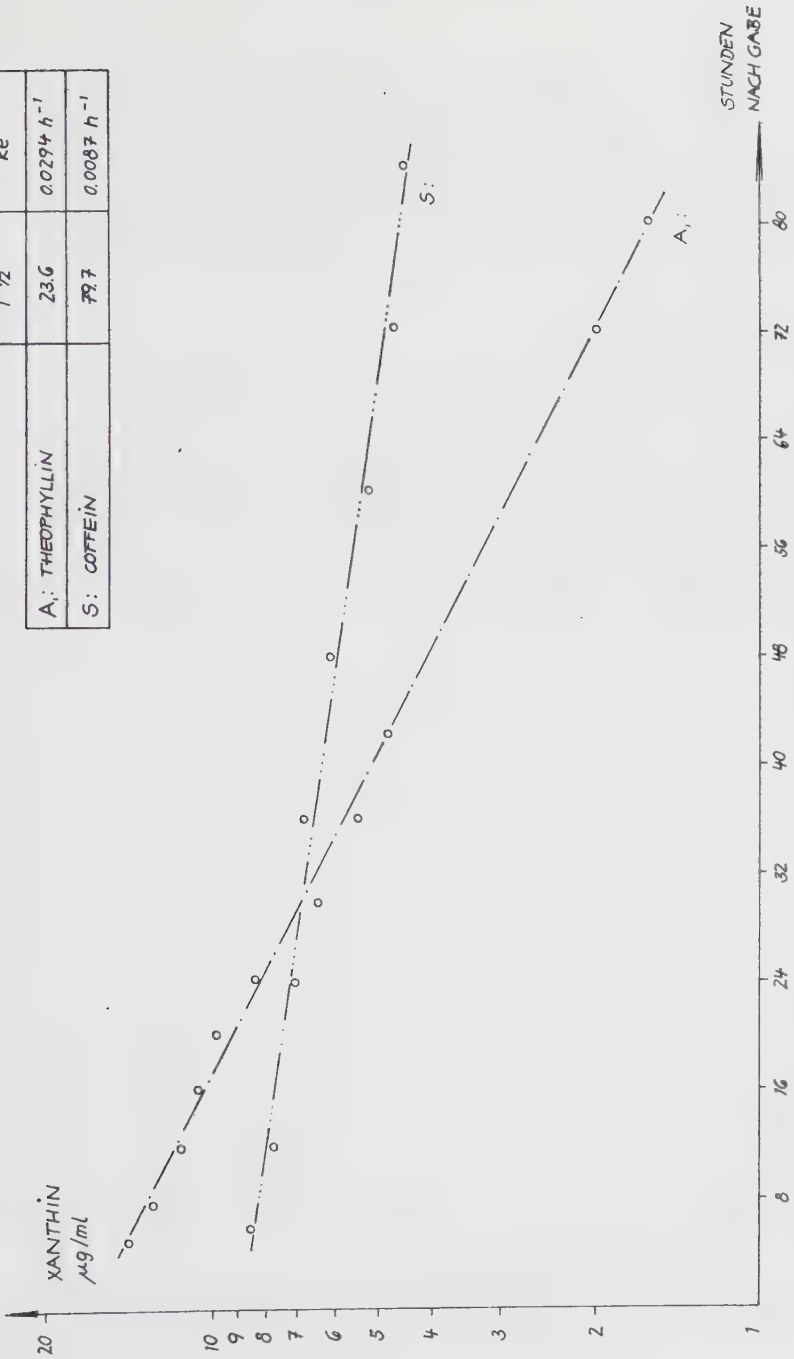


Abb. 15: HALBLOGARITHMISCHE DARSTELLUNG DER HALBWERTEZEITEN VON THEOPHYLLIN UND COFFEIN

Die mittlere Halbwertszeit dieser drei Probanden war mit 124 h gegenüber der Halbwertszeit der anderen Frühgeborenen ($\bar{x}$ = 70,6 h) deutlich verlängert (Tab.13). Die verlängerte Halbwertszeit dieser drei Frühgeborenen könnte durch eine Sättigung der abbauenden Leberenzyme erklärt werden.

2.2.1. Resorption

Zur quantitativen Erfassung der Coffeinresorption bei Frühgeborenen untersuchten wir die Coffeinplasmakonzentration zu verschiedenen Zeitpunkten nach oraler Gabe von 1%iger wässriger Coffeinelösung oder einer Coffeincitratlösung (10 mg Coffein/ml). Wie aus Tab. 14 und der Abb.16 ersichtlich wird, wurden maximale Serumkonzentrationen nach einmaliger Coffeingabe nach 30 - 120 min erreicht.

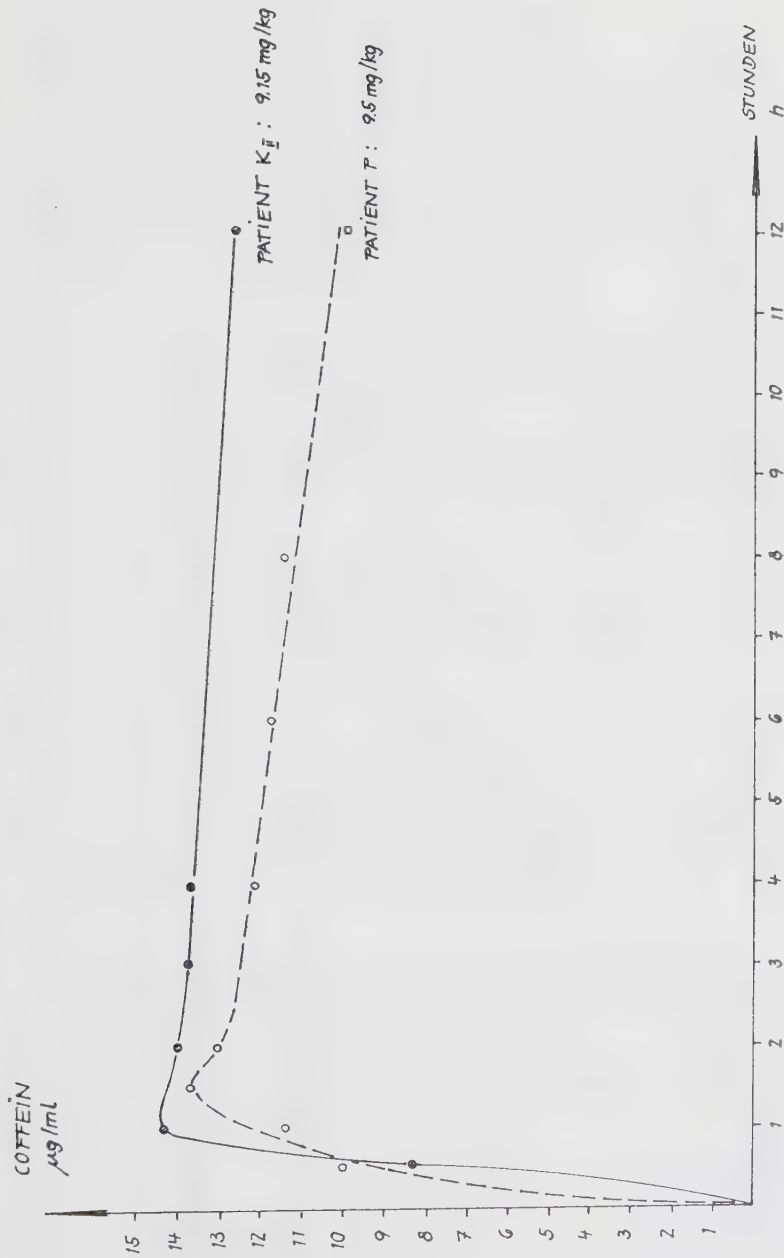


ABB. 16: RESORPTION VON COFFEIN BEI FRÜHGEBORENEEN NACH ORALER EINZELGABE

Patient	Alter z.Z.der Behandlung (Tage)	Orale Dosis (mg/kg)	Konzentrationen im Plasma (ug/ml) nach:									
			0 h	1/2 h	1 h	1 1/2 h	2 h	3 h	4 h	6 h	8 h	12 h
K II	24	9,15		8,4	14,4	14,4	14,1	13,8	13,8			12,8
S I	2	7		8,8	6,9	7,8						
S II	6	7	2,8	7,1	8,0	8	10	9,4	9,4	8,7		7,8
P	7	9,5		10	11,3	13,8	13,1		12,2	11,9	11,6	10
L	10	6,4		6,3	11,6	11,6	10,6					
B	2	4		5	5		5,3		5,1		5	

-54-

Tab. 14. Resorption von Coffein bei Frühgeborenen nach oraler Applikation.

2.2.2. Bestimmung von Coffein im Speichel

Coffein wurde in 5 Speichel- und Serumproben 6 - 50 h nach einmaliger oraler Applikation bei einem Frühgeborenen bestimmt (Tab.15). Auch die Coffeinspeichelskonzentration entspricht wie bei Theophyllin der nicht an Serumeiweiß gebundenen Fraktion, die in früheren Untersuchungen mit 95% angegeben wurde (Riechert, 1980) (Abb.17).

	Speichel (ug/ml) Serum (ug/ml)	α (%) = freie, nicht an Serumeiweiß ge- bundene Coffein- fraktion
Coffein	$\bar{x}$ = 0,95 SD = $\pm$ 0,05 VK = 5,3% n = 5	$\bar{x}$ = 94,8 SD = $\pm$ 1,4

Tab.15 Ausscheidung von Coffein im Speichel bei einem Frühgeborenen.

2.2.3. Ausscheidung von unverändertem Coffein im Urin

Bei einem Frühgeborenen wurde im 72-Stundensammelurin die Konzentration von unverändertem Coffein bestimmt. Bei einer einmaligen Gabe von 11 mg Coffein, entsprechend 6 mg/kg, fanden wir 3,79 mg Coffein im 72-Stundensammelurin.

PATIENT K: ORALE EINZELDOSE VON 6 mg/kg.
DER SPEICHEL/PLASMAQUOTIENT BETRUG 0,92 - 0,99.

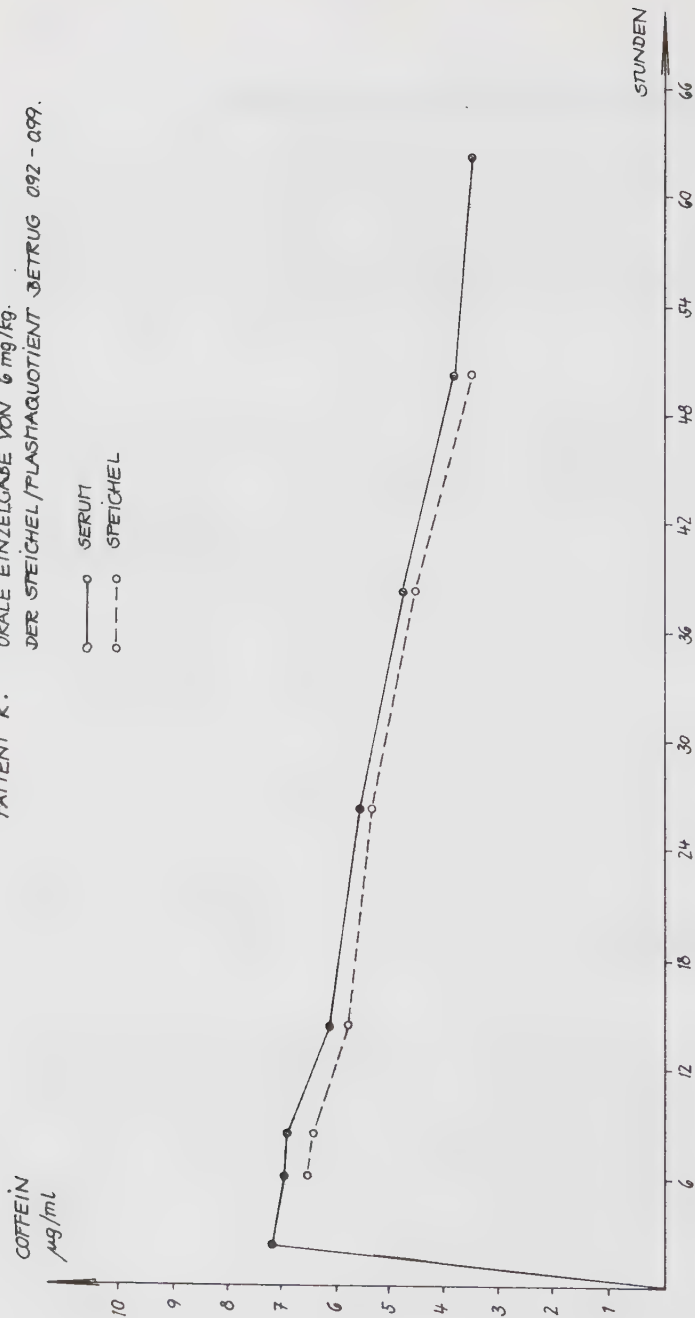
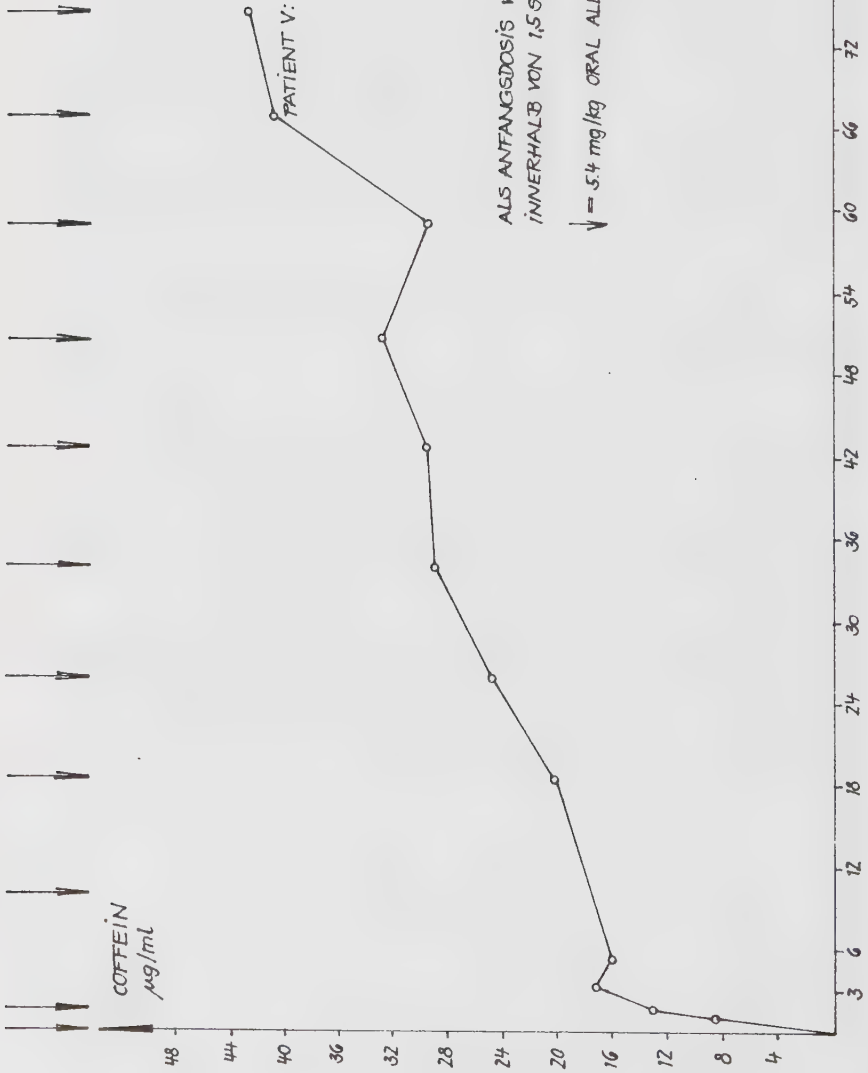


ABB. 17: KONZENTRATION VON COFFEIN IN SERUM UND SPEICHEL

Dies entspricht einer Ausscheidung von 34,5% an unverändertem Coffein in 3 Tagen. Da jedoch bei einer Halbwertszeit von 70,6 Stunden eine vollständige Elimination frühestens nach 12 Tagen zu erwarten ist, dürfte der unveränderte Anteil im Urin deutlich höher sein als 34,5%. Die im Vergleich zu Theophyllin (33,5%) höhere renale Clearance von unverändertem Coffein ist ein Hinweis für die besondere Unreife der coffeinabbauenden demethylierenden Leberenzyme beim Frühgeborenen. Bei Erwachsenen werden dagegen nur 1 - 2 % Coffein unverändert im Urin ausgeschieden (Cornish und Christman, 1957).

2.2.4. Kontrolle der Coffeinserumkonzentration bei Lanzzeittherapie

Gerade für Coffein mit einer langen Halbwertszeit von durchschnittlich 70h ist bei multipler Applikation des Xanthins zur Therapie von Apnoen bei Frühgeborenen eine Kontrolle der Serumkonzentrationen besonders wichtig. Durch Nichtbeachtung dieser langen Halbwertszeit kann sich eine stetige Kumulation von Coffein ergeben, wie Abb.18 bei einer Dosierung von 5,4 mg/kg Coffein alle 8 Stunden zeigt. Dabei wurden Serumspitzenkonzentrationen von 42 µg/ml erreicht. Als Beispiel für eine Langzeittherapie mit therapeutischen Steady-state-Plasmakonzentrationen um 8 µg/ml ist Abb.19 angegeben.



ALS ANFANGSDOSIS WURDEN $2 \times 54 \text{ mg/kg}$
INNERHALB VON 1,5 STUNDEN AFFLIZIERT.

$\downarrow = 54 \text{ mg/kg}$ ORAL ALLE ACHT STUNDEN

PATIENT V:

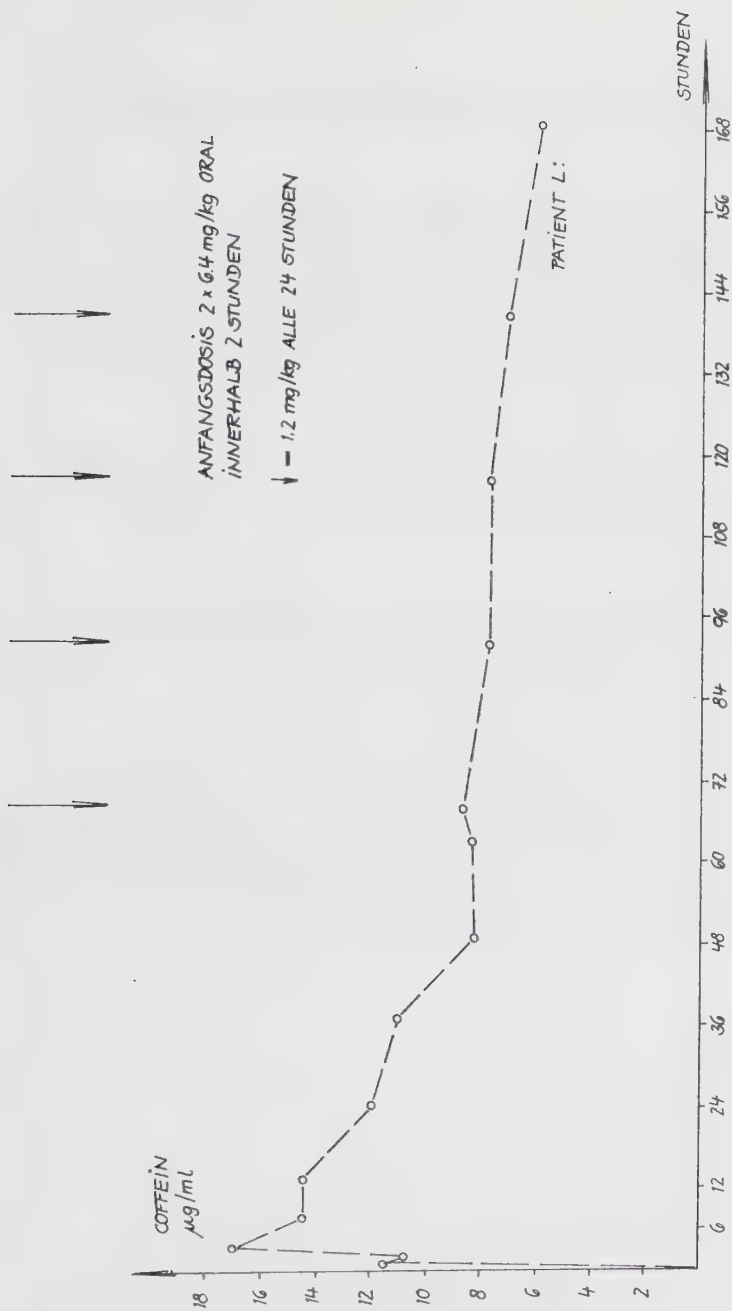


ABB. 19: LANGZEITTHERAPIE MIT COFFEIN MIT STEADY-STATE - PLASMAKONZENTRATIONEN UM $8 \mu\text{g/ml}$.

3. Biotransformation von Theophyllin zu Coffein bei Frühgeborenen

Während die demethylierenden Leberenzyme bei Frühgeborenen insuffizient sind und Coffein als Trimethylxanthin eine signifikant längere Halbwertszeit (70,6h) als das Dimethylxanthin Theophyllin (23,4h) aufweist, wird ein Teil des applizierten Theophyllins durch das Enzym Methylase zu Coffein bei Frühgeborenen methyliert.

Nach der Arbeit von Bory et al., 1979 wurde nach Erreichen einer Theophyllinserumkonzentration von 16 mg/l eine Coffeinplasmakonzentration von 5-6 mg/l gemessen.

Wir untersuchten daher an zwei Frühgeborenen mit einer Kurzzeittherapie (4-5 Tage) und einem Frühgeborenen mit einer Langzeittherapie (41 Tage) die Biotransformation von Theophyllin zu Coffein.

Die untersuchten Frühgeborenen erhielten keine Muttermilch, da diese Coffein enthalten kann. Die Serumkonzentration von Coffein lag vor Beginn der Theophyllintherapie unter 0,5 µg/ml. Coffeinserumkonzentrationen von über 0,5 µg/ml wurden 16-36 Stunden nach der ersten Theophyllindosis bestimmt (Abb. 20/21/22).

Tab.16 zeigt das Ausmaß der Methylierung von Theophyllin zu Coffein

Kind	Theophyllin (ug/ml)	Coffein (ug/ml)	Coffein/Theophyllin- Quotient
C	8,3	3	0,36
S	11,3	3,4	0,30
H	17,1	4,8	0,28
			$\bar{x} = 0,31$

Tab. 16 Biotransformation von Theophyllin zu Coffein.

Bei den untersuchten Frühgeborenen erreichten die Coffeinserumkonzentrationen im Mittel 31% der Theophyllinserumkonzentration.

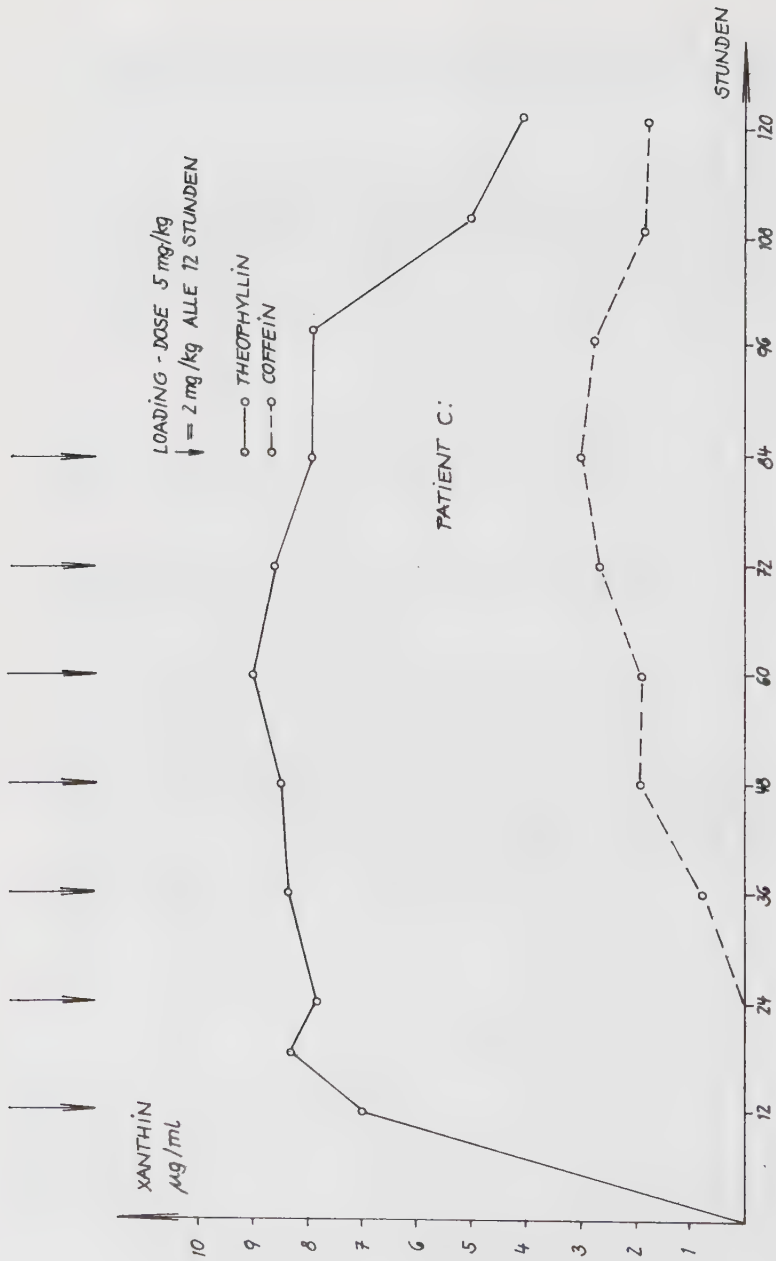


ABB. 20: BIOTRANSFORMATION VON THEOPHYLLIN ZU COFFEIN DURCH METHYLIERUNG

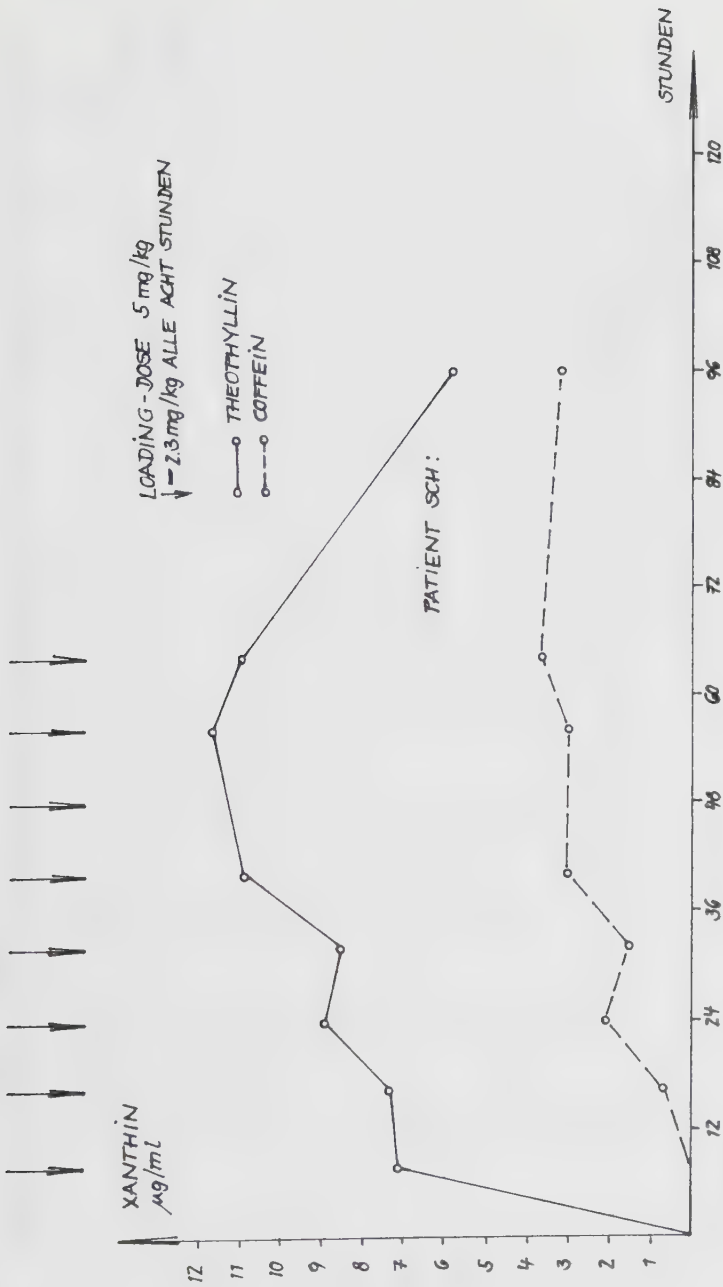


ABB. 21: BIOTRANSFORMATION VON THEOPHYLLIN ZU COFFEIN DURCH METHYLIERUNG

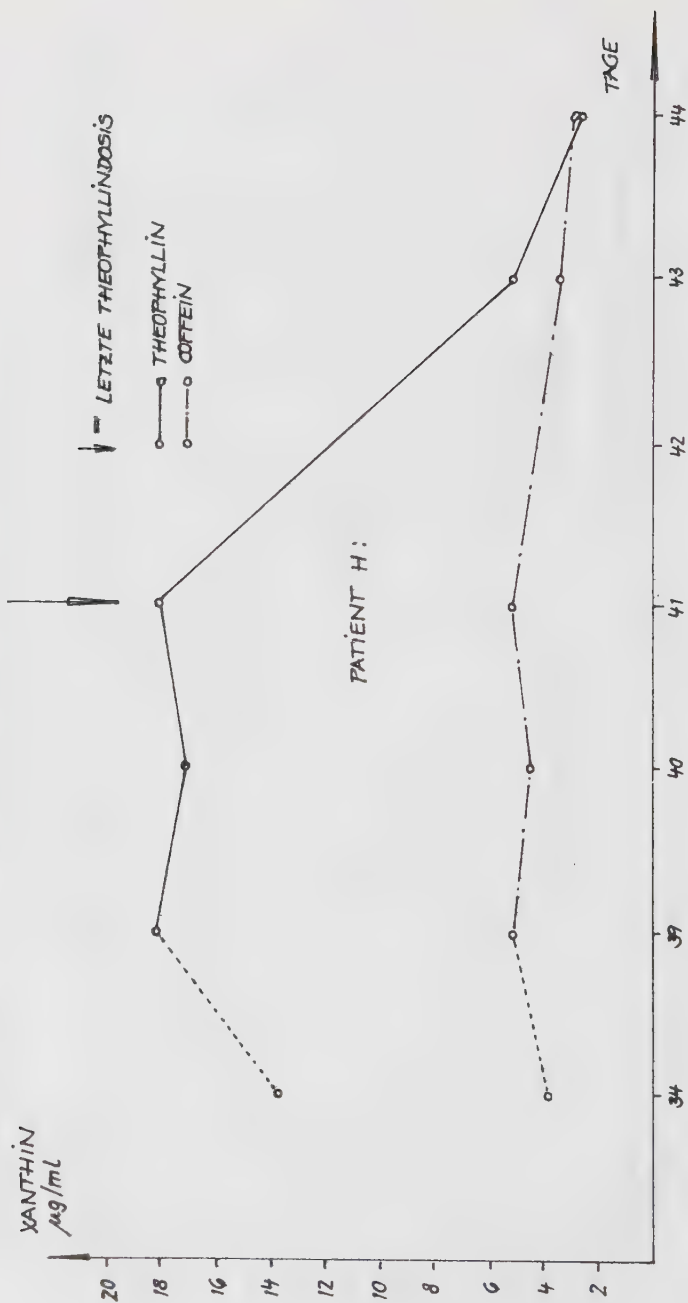


ABB. 22: BIOTRANSFORMATION VON THEOPHYLLIN DURCH METHYLIERUNG ZU COFFEIN BEI LANGEZEITHTHERAPIE (STEADY-STATE).

IV. Diskussion

Mit der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Mikromethode können aus 5-10, μ l biologischer Flüssigkeit ohne vorherige Extraktion die Xanthine mit einem Variationskoeffizient von 2-3 % bestimmt werden. Beim Auftragen von 5-10, μ l der jeweiligen biologischen Flüssigkeit können therapeutische Spiegel von 5 - 20, μ g/ml gemessen werden. Durch Änderung der Scan-Geschwindigkeit wurden noch Konzentrationen von 1, μ g/ml nachgewiesen. Diese Mikromethode ist besonders geeignet für die multiple Bestimmung von Serumkonzentrationen bei Frühgeborenen. Bei Intoxikationsverdacht können die Xanthine halbquantitativ auf Grund ihrer Fluoreszenzlösung innerhalb von 50 Minuten nachgewiesen werden. Endogene Substanzen, wie Bilirubin und Hämoglobin (bei Haemolyse), stören ebenso wie Xanthin, Hypoxanthin und Harnsäure die Messung nicht. Auch in der Intensivtherapie von Frühgeborenen verwendete Medikamente (Tab.4) haben keinen störenden Einfluß auf die Methode.

Mit dem Fließmittel Chloroform - Methanol (90:10) werden außerdem die Metabolite der Xanthine (Methyl-Xanthine, Methylharnsäure) von Theophyllin und Coffein auf Grund ihrer R_F -Werte getrennt und stören die Messung nicht.

Theobromin muß durch das Fließmittel Äthylazetat - Methanol - 25%iger Ammoniak (80:20:10) von Theophyllin und Coffein getrennt werden.

Die beste Trennung der 1-, 3-, 7-Methylxantinderivate wurde mit dem Fließmittel Äthylacetat-Isoamylalkohol - Isopro-

panol - 25 % NH_3 -Aqua dest. (24:32:32:12:4) erreicht.
Weitere Untersuchungen zur quantitativen densitometrischen Bestimmung der Metabolite sind in Vorbereitung.

Die Empfindlichkeit ist mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Xanthin ausreichend.
Die beschriebene Mikromethode wurde bei Frühgeborenen, Kindern und Erwachsenen im Serum, Speichel und Urin erfolgreich angewendet.

I. Pharmakokinetik der Xanthine

1.1. Resorption der Xanthine

Nach oraler Applikation wässriger Xanthinlösungen werden bei Frühgeborenen Serumspitzenkonzentrationen von Coffein nach durchschnittlich einer Stunde und von Theophyllin nach zwei Stunden erreicht (Tab.10/14). Bei Erwachsenen werden Serumspitzenkonzentrationen von Coffein nach 1/2 bis 1 Stunde angegeben (Sant' Ambrogio et al., 1964, Axelrod und Reichenthal, 1953) und von Theophyllin je nach Applikationsform (Elixier oder Tablette) nach 1 - 2 Stunden (Ogilvie, 1978).

Serumspitzenkonzentrationen der Xanthine werden somit nach oraler Applikation bei Frühgeborenen und Erwachsenen etwa zum gleichen Zeitpunkt erreicht. Cottancin et al. (1977) erhielten bei Frühgeborenen nach Applikation einer 20%igen alkoholischen Theophyllinlösung ebenfalls nach 30-120 Minuten Serumspitzenkonzentrationen.

Weitere Untersuchungen zur Resorptionsgeschwindigkeit und Bioverfügbarkeit vor allem von Theophyllin bei Frühgeborenen sind jedoch notwendig.

Coffein wird bei Erwachsenen bereits im Magen resorbiert, wobei die Resorption mit steigendem pH des Magensaftes zunimmt. Da bei Frühgeborenen die Salzsäureproduktion stark vermindert ist und die Magenentleerungszeit bis zu 6-8 Stunden verlängert sein kann (Yaffe und Yuchau, 1974, Morselli 1976) könnte beim Frühgeborenen mehr Coffein bereits im Magen resorbiert werden als bei Erwachsenen. Die orale Gabe wässriger Xanthinlösungen ist eine geeignete Applikationsform, um bei Frühgeborenen rasch wirksame Theophyllin- und Coffeinserumkonzentrationen im Rahmen der Apnoetherapie zu erreichen. Es ist deshalb nicht notwendig, alkoholische Theophyllinlösungen (10%ige oder 20%ige alkoholische Lösungen, Uauy et al., 1975, Shannon et al., 1975, Cottancin et al., 1977) zu applizieren. Außerdem können toxische Nebenwirkungen des Alkohols auf Grund eines verminderten Abbaus (Alkoholdehydrogenase) in der Leber von Frühgeborenen und einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Alkohol nicht ausgeschlossen werden.

Die rektale Applikation von Theophyllin in Form von Suppositorien ergab eine zunehmende Kumulation bei einem Dosierungsintervall von 8 Stunden. Da entsprechende Dosierungen bei oraler Gabe keine Kumulation bewirken, dürfte die Ursache in einer verzögerten biologischen Verfügbarkeit von Theophyllin aus seiner rektalen Applikationsform liegen. Etwa eine halbe Stunde nach rektaler Applikation von Aminophyllinzäpfchen wurden jedoch von anderen Autoren bereits Serumspitzenkonzentrationen von 12 µg/ml angegeben (Kuzemko, 1976).

Weitere vergleichende Untersuchungen zur rektalen Gabe von Theophyllin, Coffein und Aminophyllin sind jedoch notwendig, um diese Applikationsform für die Apnoetherapie empfehlen zu können.

1.2. Speichelkonzentrationen der Xanthine

Die Speichelkonzentration von Theophyllin bei Frühgeborenen entspricht der Konzentration an freiem, nichtproteingebundenem Medikament im Plasma (Tab.11), d.h. der $\frac{\text{Speichel}}{\text{Serum}}$ - Quotient = 0,73.

Bisher wurden keine Daten über die Speichelkonzentration von Medikamenten bei Frühgeborenen veröffentlicht. Für mehrere Medikamente wurden bei Erwachsenen signifikante Korrelationen zwischen der Speichelkonzentration und der Konzentration des freien, nicht an Eiweiß gebundenen Medikaments nachgewiesen (Danhof und Breimer, 1978).

Die Speichelkonzentration von Theophyllin ist bei Erwachsenen unabhängig vom Speichelfluß und Speichel-pH (Koysooko et al., 1974). Größere intra- und interindividuelle Schwankungen des Speichel/Plasma Quotienten von Theophyllin bei Erwachsenen schränken jedoch die Bedeutung der Speichelkonzentrationbestimmung von Theophyllin zur Therapiekontrolle (z.B. Asthma) ein (Danhof und Breimer, 1978).

Da der Speichel/Plasma-Quotient von Theophyllin in der Resorptionsphase bei Erwachsenen höher ist als in der Eliminationsphase (De Blaey und De Boer, 1976, Knop et al., 1975) bestimmten wir die Theophyllinkonzentrationen

im Speichel und Plasma jeweils vor der Xanthingabe unter Steady-State-Bedingungen.

Die Speichelkonzentration von Coffein entspricht ebenfalls der freien Medikamentkonzentration im Plasma (Tab.15) d.h. der $\frac{\text{Speichel}}{\text{Serum}}$ - Quotient = 0,95.

Da Coffein praktisch nicht an Serumproteine gebunden wird, ist die Speichelkonzentration mit der Serumkonzentration praktisch identisch. Bei Erwachsenen wurden dagegen nur 55 % der Coffeinplasmakonzentration im Speichel gefunden (Horning et al., 1977). Möglicherweise ist diese geringe Konzentration von Coffein im Speichel von Erwachsenen, die nicht der freien Plasmakonzentration entspricht, durch Unterschiede in der Ausscheidung von Medikamenten im Speichel zwischen Frühgeborenen und Erwachsenen zu erklären.

Nach den Arbeiten von Cook et al. (1976) und Parsons and Neims (1978) wurden im Gegensatz zu den Ergebnissen von Horning et al. (1977) auch bei Erwachsenen Speichel-Serumquotienten von 0,9 - 1,02 gefunden.

Nach den bisher an einer kleinen Zahl von Frühgeborenen von uns durchgeführten Untersuchungen ist die Bestimmung der Xanthinkonzentration im Speichel besonders zur Überwachung der Apnoetherapie geeignet, da sie einen direkten Hinweis auf das freie, pharmakologisch wirksame Xanthin gibt.

1.3. Halbwertszeit, Clearance und Dosierung der Xanthine

1.3.1. Theophyllin

Von Giacoia et al. (1976) und Aranda et al. (1976) wurde bei Frühgeborenen im Vergleich zu Kindern und Erwachsenen eine signifikant längere Halbwertszeit und niedrigere Clearance nachgewiesen. Aranda und Mitarbeiter

fanden bei Frühgeborenen mit einem mittleren postnatalen Alter von 7,5 Tagen (3-15 Tage) eine Halbwertszeit von 30,2h (14,4 - 57,7h), während Giacoia et al. bei einem mittleren postnatalen Alter von 41 Tagen eine durchschnittliche Halbwertszeit von 20 Stunden angeben.

Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, daß die demethylierenden Leberenzyme bei Frühgeborenen insuffizient sind und mit zunehmendem postnatalen Alter reifen.

Da die oben genannten Untersuchungen nur an einer geringen Zahl von Frühgeborenen ($n = 14$) durchgeführt wurden, untersuchten wir bei weiteren 12 Frühgeborenen die Halbwertszeit, Clearance und das Verteilungsvolumen von Theophyllin. Die pharmakokinetischen Daten wurden bei 6 Frühgeborenen mit einem mittleren postnatalen Alter von 7 Tagen (Gruppe I) und bei 6 Frühgeborenen mit einem mittleren postnatalen Alter von 21 Tagen (Gruppe II) ermittelt.

Wir fanden bei Gruppe I eine signifikant längere Halbwertszeit ($P < 0,01$) im Vergleich zur Gruppe II.

Unsere Ergebnisse stimmen mit den Angaben von Aranda und Giacoia überein (Tab.7), wobei sich eine durchschnittliche Halbwertszeit (Gruppe I und Aranda) von 27,4h bei einem mittleren postnatalen Alter von 7 Tagen ergibt.

Bei einem mittleren postnatalen Alter von 30 Tagen (Gruppe II und Giacoia) beträgt die Halbwertszeit 19h. Entsprechend der verlängerten Halbwertszeit ist die Clearance im Vergleich zu Kindern (1-4 Jahre) und Erwachsenen signifikant erniedrigt (Tab.9). Die durchschnittlichen Werte für die Halbwertszeit bzw. Clearance bei 26 Frühgeborenen betragen 23,4 Stunden bzw. 29 ml/kg/h.

Für Gruppe I und II wurde ein durchschnittliches Verteilungsvolumen von 0,92 (l/kg) gefunden, wobei sich das Verteilungsvolumen beider Gruppen nicht signifikant unterscheidet. Theophyllin wird im Serum von Frühgeborenen signifikant weniger gebunden als bei Erwachsenen (Aranda et al., 1976, Riechert et al., 1980), so daß bei identischer Serumkonzentration bei Frühgeborenen auf Grund einer höheren Konzentration an freiem Theophyllin stärkere pharmakologische Wirkungen am Rezeptor zu erwarten sind.

Theophyllin verteilt sich entsprechend dem Wassergehalt rasch im Extrazellulärraum. Auf Grund des erhöhten Extrazellulärraumes und der verminderten Eiweißbindung von Theophyllin bei Frühgeborenen ist das Verteilungsvolumen gegenüber Erwachsenen (0,3 - 0,5 l/kg) (Ogilvie et al., 1978) erhöht.

Der Quotient $\frac{\text{Extrazellulärraum}}{\text{Intrazellulärraum}}$ kann bei Frühgeborenen je nach Flüssigkeitsbilanz (Exsikkose oder Ödem) erhebliche Schwankungen aufweisen und damit auch die Serumkonzentration der Xanthine.

Die Untersuchung der Theophyllinausscheidung im Urin ergab bei den beiden untersuchten Frühgeborenen einen unveränderten Anteil von 31-35% im Vergleich zu 6-12% bei Erwachsenen. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Unreife der demethylierenden Leberenzyme bei Frühgeborenen.

Dosierung von Theophyllin bei Frühgeborenen mit Apnoen

Auf Grund der oben genannten pharmakokinetischen Daten sind bei der Behandlung von Frühgeborenen besondere Kriterien zu beachten. Therapeutische Serumkonzentrationen für Theophyllin wurden bei der Apnoebehandlung von Frühgeborenen mit 6-14 µg/ml Serum angegeben (Shannon et al., 1975, Aranda et al., 1976). Bedingt durch das größere Verteilungsvolumen und die lange Halbwertszeit bei Früh-

geborenen muß zur schnellen Erlangung einer wirksamen Serumkonzentration eine höhere erste Dosis (Loading-dose) verabreicht werden. Zur Erreichung einer Serumkonzentration von z.B. 10 µg/ml ist eine mittlere Loading-dose von 9 mg/kg bei einem mittleren Verteilungsvolumen von 0,9 (l/kg) notwendig.⁺

Wegen der Schwankungen des Verteilungsvolumen (0,72 - 1,26 l/kg, Tab. 5 und 6) ist die benötigte Loading-dose unterschiedlich. Bei einem Verteilungsvolumen von 0,72 ist zur Erreichung von 10 µg/ml Theophyllin eine erste Dosis von 6,5 mg/kg notwendig, während bei einem Verteilungsvolumen von 1,26 (l/kg) 11,3 mg/kg für das Erreichen derselben Serumkonzentration gegeben werden müssen. Da nach Applikation der mittleren Loading-dose von 9 mg/kg je nach Verteilungsvolumen Serumkonzentrationen von 7 - 12 µg/ml Theophyllin zu erwarten sind, ist die Bestimmung der Serumkonzentration etwa 2 Stunden nach der Applikation zu empfehlen.

Zur Erreichung einer Steady-state-Konzentration von 10 µg/ml ist nach unseren pharmakokinetischen Daten (Tab. 5 und 6) mit einer mittleren Clearance von 30 ml/kg/h eine durchschnittliche Erhaltungsdosis von 7,2 mg/kg/24h nötig.⁺⁺

Um möglichst geringe Schwankungen der Theophyllinkonzentrationen zwischen den Dosierungsintervallen zu erhalten, sollte die 24 - Stunden-Dosis auf 3 Applikationen verteilt werden, d.h. 8 stündlich 2,5 mg/kg.

⁺ Loading dose (9 mg/kg) = cp^0 (10 µg/ml) · VD (0,9 l/kg)
(Giacoia et al. 1976).

⁺⁺ Erhaltungsdosis (mg/kg/Tag) = cp^{SS} (10 µg/ml) · Cl_{tot} (l/kg/24h).
(Giacoia et al. 1976).

Die oben genannte Tagesdosis von 7 mg/kg sollte bei Frühgeborenen innerhalb der 1. und 2. Lebenswoche appliziert werden, während durch die signifikant höhere Clearance in der 3. - 4. Lebenswoche (Tab. 5 und 6) eine höhere orale Erhaltungsdosis (9 - 12 mg/kg/24h) zu empfehlen ist.

Die von Shannon et al. angegebenen therapeutischen Serumkonzentrationen von 6-14 µg/ml sind nach eigenen Erfahrungen und nach Angaben von Eisenberg et al. (1978) bei einem Teil der Frühgeborenen zu niedrig, um eine signifikante Abnahme der Apnoefrequenz zu erreichen. Um in diesen Fällen eine wirksame Serumkonzentration von etwa 15 µg/ml bei einer mittleren Clearance von 30 (ml/kg/h) zu erreichen, muß die Tagesdosis entsprechend erhöht werden (12 mg/kg/24h).

Bisher wurde die Theophyllinkinetik bei insgesamt 26 Frühgeborenen untersucht (Tab.8). Die von uns nachgewiesene signifikant längere Halbwertszeit bzw. signifikant kleinere Clearance bei Frühgeborenen innerhalb der ersten Lebenswoche werden durch die Angaben von Aranda et al. (1976) unterstützt, die 6 Frühgeborenen mit einem mittleren postnatalen Alter von 7,5 Tagen behandelten. Die von uns gefundene signifikant kürzere Halbwertszeit bzw. höhere Clearance bei Frühgeborenen in der 2. - 3. postnatalen Woche werden durch die Ergebnisse von Giacoia et al. (1976) bestätigt, die Frühgeborene mit einem mittleren postnatalen Alter von 41 Tagen behandelten.

1.3.2. Coffein

Die einzigen pharmakokinetischen Daten über Coffein bei der Behandlung von Frühgeborenen mit Apnoen sind Angaben der Halbwertszeit mit einer erheblichen Variabilität von 40 bis 231 h (Aranda et al., 1977).

Dieses Ergebnis wurde bei 18 Frühgeborenen mit einem mittleren Geburtsgewicht von 1065 g [±] 72 und einem mittleren

Gestationsalter von 27,5 SSWo erhalten.

Diese Untersuchungen gaben einen ersten Hinweis auf eine extrem verlängerte Halbwertszeit von Coffein bei Frühgeborenen im Vergleich zu Erwachsenen.

Wir untersuchten deshalb erstmals bei 9 Frühgeborenen (mittleres Gestationsalter 32,7 SS Wo, mittleres Geburtsgewicht 1533 g) für die therapeutische Anwendung von Coffein weitere pharmakokinetische Parameter. Für 6 Frühgeborene erhielten wir nach oraler bzw. intramuskulärer Applikation eine mittlere Halbwertszeit von 70,6 h (53,2 - 84,5 h) und können somit die signifikant längere Halbwertszeit für Coffein gegenüber Theophyllin bei Frühgeborenen bestätigen. Im Vergleich zum Erwachsenen (mittlere Coffein-Halbwertszeit von 2-4 h) wird die Unreife der demethylierenden Leberenzyme bei Frühgeborenen besonders deutlich. Die signifikant verlängerte Halbwertszeit gegenüber Theophyllin bei Frühgeborenen erklärt sich aus der chemischen Struktur von Coffein, das als 1,3,7-Trimethylxanthin eine Methylgruppe mehr als Theophyllin (1,3-Dimethylxanthin) im Molekül enthält.

Ferner fanden wir eine mittlere Clearance von 8,6 (mg/kg/h) (5,4 - 14), die signifikant kleiner ist als die für Theophyllin (30 mg/kg/h) bei Frühgeborenen. Dabei entspricht das mittlere Verteilungsvolumen von 0,84 (l/kg) (0,57 - 1,08) in etwa dem mittleren Verteilungsvolumen von Theophyllin bei Frühgeborenen (0,96 l/kg).

Bei drei Frühgeborenen stellte sich während der Therapie mit einer durchschnittlichen Tagesdosis von 3 x 4,9 mg/kg eine Kumulation von Coffein bei maximalen Serumkonzentrationen von 42 µg/ml ein, ohne daß Steady-State-Plasmakonzentrationen erreicht wurden.

Die bei diesen 3 Probanden erhaltene mittlere Halbwertszeit war mit 124,1 Stunden deutlich länger als die Halbwertszeit der 6 Frühgeborenen ohne Kumulation ($\bar{x}$ = 70,6) (Tab.13).

Die extrem verzögerte Elimination bei diesen mit hohen Coffeindosen behandelten Frühgeborenen und bei einem Teil der Probanden von Aranda et al. (1977) könnte auf Grund der hohen Serumkonzentrationen durch eine Sättigungskinetik (Abbau 0 - ter Ordnung) erklärt werden.

Bei einem Frühgeborenen fanden wir nach einer einmaligen Applikation von 6 mg/kg Coffein einen prozentualen Anteil von 34,5 % an unverändertem Coffein im 72 - Stundenurin. Da jedoch bei einer Halbwertszeit von 54 Stunden dieses Patienten eine vollständige Elimination von Coffein erst nach etwa 9 Tagen zu erwarten ist, dürfte der Wert von 34,5% an unverändert ausgeschiedenem Coffein noch höher liegen. Bei Erwachsenen werden nur 1 - 2 % Coffein unverändert im Urin ausgeschieden (Cornish und Christman, 1957). Der signifikant höhere Anteil von unverändertem Coffein im Urin bei Frühgeborenen unterstreicht einerseits die Insuffizienz der demethylierenden Leberenzyme (Cytochrom P 450), andererseits ist es Ausdruck der großen, nicht an Serumproteine gebundenen frei filtrierbaren Coffeinfraction (94,8%).

Dosierung von Coffein bei Frühgeborenen mit Apnoen

Im Vergleich zu Theophyllin sind nur wenige Angaben zur Dosierung von Coffein bei Frühgeborenen mit Apnoen bekannt. Eine erste Dosis von 10 mg/kg und nach 2-3 Tagen eine Erhaltungsdosis von 1 - 2 mal 2,5 - 5 mg/kg Coffein täglich wurden empfohlen (Aranda et al., 1977).

Koppe et al.(1974), die die extrem niedrige Coffein - Clearance bei Frühgeborenen nicht berücksichtigten, gaben die Dosierung mit 6 x 1 mg bzw. 6 x 2 mg Coffein täglich an. Diese genannten Coffeindosen können jedoch, wie wir zeigen konnten (Tab.13), auf Grund der stark verzögerten Elimination von Coffein zu einer Kumulation führen, so daß Serumkonzentrationen von über 30 µg/ml erreicht werden. Die lange Halbwertszeit von Coffein (70,6h) ermöglicht ein längeres Dosierungsintervall von 24h.

Für eine multiple Gabe von Coffein bei der Langzeittherapie apnoischer Frühgeborenen ist eine geringere Erhaltungsdosis

im Vergleich zu Theophyllin erforderlich. Zur Erreichung einer Serumkonzentration von z.B. $10 \mu\text{g/ml}$ Coffein ist ebenso wie für Theophyllin eine Loading-dose von $8,4 \text{ mg/kg}$ Coffein notwendig.

Die Erhaltungsdosis für Coffein, basierend auf einer mittleren Clearance von $8,6 \text{ (mg/h/kg)}$, ist für eine Serumkonzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ signifikant kleiner als für Theophyllin, nämlich $2,1 \text{ mg/kg/24h}$.

Die durch eine Streuung des Verteilungsvolumens ($0,57 - 1,08 \text{ l/kg}$) erforderliche Anpassung der Loading-dose und die Neigung zur Kumulation bei einer Coffeinlangzeittherapie macht eine kontinuierliche Serumverlaufskontrolle mit der von uns beschriebenen Methode notwendig.

Um Steady-State Plasmaspiegel von 10 bis $20 \mu\text{g/ml}$ zu erreichen, ist eine mittlere tägliche Erhaltungsdosis von $2 - 3 \text{ mg/kg}$ Coffein zu applizieren. Auf Grund der langen Halbwertszeit von Coffein kann die Tagesdosis 12- oder 24-stündlich gegeben werden, ohne daß stärkere Fluktuationen der Serumspiegel auftreten.

2. Biotransformation von Theophyllin zu Coffein bei Frühgeborenen

Wie aus der signifikant längeren Halbwertszeit von Coffein und Theophyllin bei Frühgeborenen im Vergleich zum Erwachsenen ersichtlich, ist neben der besonderen renalen Situation des Frühgeborenen, vor allem die Unreife der demethylierenden Leberenzyme des Cytochromsystems an der veränderten Pharmakokinetik der Xanthine beteiligt. Anhaltspunkte für einen möglichen metabolischen Nebenweg beim Abbau von Theophyllin ergaben sich aus der Tatsache, daß beim Aufbau des Surfactant (Antiatelektasenfaktor) N-methylierende Leberenzyme ebenso mitwirken, wie bei der im Frühgeborenenalter bereits stattfindenden Methylierung von Noradrenalin zu Adrenalin.

In Anlehnung an die Arbeit von Bory et al. (1979) untersuchten

wir bei drei Frühgeborenen mit Apnoen das Ausmaß der Biotransformation von Theophyllin zu Coffein. 1 - 2 Tage nach der ersten Dosis von Theophyllin waren bereits Coffeinspiegel meßbar, die nach Erreichen von Theophyllin-Steady-State-Serumkonzentrationen-einer der Probanden wurde 44 Tage mit Theophyllin behandelt - durchschnittlich 31% der Theophyllinserumkonzentrationen erreichten. Da die von uns angegebenen bei Apnoen wirksamen Theophyllinserumkonzentrationen um $15\mu\text{g/ml}$ liegen, belaufen sich die zu erwartenden Coffeinspiegel auf etwa $5\mu\text{g/ml}$.

Obgleich wir die bei Apnoen wirksamen Coffeinkonzentrationen mit $10 - 20\mu\text{g/ml}$ angeben, dürfte die im Vergleich zu Theophyllin stärkere pharmakologische Wirkung von Coffein auf das ZNS (Tab. 1) auch bei Plasmaspiegeln von $5\mu\text{g/ml}$ zentralstimulierende Einflüsse haben.

Es liegt somit nahe, die zentralstimulierende Wirkung von Theophyllin teilweise dem durch Biotransformation entstandenen Coffein zuzuschreiben. Im Hinblick auf die Apnoebehandlung von Frühgeborenen mit Theophyllin kann durch die hier beschriebene Mikromethode Coffein auf Grund der unterschiedlichen RF-Werte in einem Arbeitsgang ermittelt werden. Es empfiehlt sich somit bei Theophyllinlangzeittherapie in die Verlaufskontrolle auch die Bestimmung der Coffeinplasmaspiegel einzubeziehen.

Die generelle Frage nach der Effektivität der Theophyllintherapie im Vergleich zu Coffein bei Frühgeborenen mit Apnoen sollte im Hinblick auf die Biotransformation und die stärker atemstimulierende Wirkung von Coffein in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde mit einer an die Durchführung in der Klinik orientierten Mikromethode die Pharmakokinetik von Theophyllin und Coffein bei Frühgeborenen mit Apnoen untersucht.

Das Besondere dieser Mikromethode liegt in der geringen Belastung des Frühgeborenen, da nur 5 - 20 μ l der jeweiligen biologischen Flüssigkeit benötigt werden. Ferner zeichnet sie sich durch ihre hohe Empfindlichkeit (bis zu 1 μ g/ml), eine geringe Störanfälligkeit und durch die Möglichkeit einer schnellen semiquantitativen Bestimmung zum Ausschluß einer Intoxikation aus. Unter Berücksichtigung der besonderen pharmakokinetischen Verhältnisse beim Frühgeborenen bestimmten wir für 12 apnoische Patienten die Theophyllinhalbwertszeit, während bei 11 dieser Frühgeborenen zusätzlich die Clearance und das Verteilungsvolumen ermittelt wurden.

Eingeteilt in zwei Gruppen von je 6 Patienten ergaben sich in Abhängigkeit vom postnatalen Alter (Gruppe I: 1. - 9. Lebenstag, Gruppe II: 10. - 36. Lebenstag) für die Gruppe I eine durchschnittliche Halbwertszeit von 24,5 h, eine Clearance von 24,6 (ml/h/kg) und ein Verteilungsvolumen von 0,86 (l/kg).

Die Halbwertszeit der Gruppe II (18,9 h) ist signifikant niedriger ($p < 0,01$) und die Clearance (37,4 ml/kg/h) höher im Vergleich zur Gruppe I. Für Erwachsene ergibt sich im Vergleich zu Frühgeborenen eine signifikant kürzere Halbwertszeit (6,7 h) und eine entsprechend höhere Clearance (66 ml/kg/h). Dies spricht für eine Reifung der theophyllin-metabolisierenden Leberenzyme nach der 3. - 4. Lebenswoche.

Weiter wurde die Resorption von Theophyllin nach oraler Applikation untersucht. Es fanden sich maximale Serumkonzentrationen 2-4 h nach oraler Applikation.

Bei rektaler Gabe fand sich auf Grund einer verzögerten biologischen Verfügbarkeit bei einem Frühgeborenen eine zunehmende Kumulation der Serumtheophyllinkonzentration.

Wir ermittelten ferner die Speichelkonzentration, die der freien, nicht an Serumproteine gebundenen Theophyllinkonzentration (72,6%) entspricht.

Im 24-Stundenurin bestimmten wir die Ausscheidung von unverändertem Theophyllin, die 30 bis 35% der Theophyllintagesdosis ausmacht. Beim Erwachsenen werden 6-12% an unverändertem Theophyllin ausgeschieden, ein weiterer Hinweis für die Unreife der demethylierenden Leberenzyme bei Frühgeborenen.

Für Coffein fanden wir bei 6 Frühgeborenen eine mittlere Halbwertszeit von 70,6 h, eine Clearance von 8,6 (mg/kg/h) und ein Verteilungsvolumen von 0,84 (l/kg). Auch für Coffein zeigt sich im Vergleich zu Erwachsenen an Hand der Halbwertszeit (2-4 h) die Unreife der Leberenzyme bei Frühgeborenen.

Nach oraler Applikation von Coffein fanden sich maximale Serumkonzentrationen nach 1/2 bis 2 Stunden. Ebenso wie für Theophyllin entsprach die Coffeinkonzentration im Speichel der nicht an Serumeiweiß gebundenen Fraktion (95%). Der von uns gefundene Speichelplasmaquotient (0,95) stimmt mit dem des Erwachsenen (0,89 - 1,02) überein.

Die Ausscheidung von unverändertem Coffein im Urin, bestimmt im 72-Stundensammelurin eines Frühgeborenen, belief sich auf 34,5% der verabreichten Dosis, während bei Erwachsenen nur 1-2 % unverändert ausgeschieden werden.

Die erstmals von Bory et al. (1979) beschriebene Bio-transformation von Theophyllin zu Coffein untersuchten wir an drei unserer mit Theophyllin behandelten Frühgeborenen.

Das Ausmaß der Methylierung von Theophyllin zu Coffein erreichte im Mittel 31% der Theophyllinserumkonzentration.

Unter Verwendung der von uns ermittelten pharmakokinetischen Daten berechneten wir die Dosierung von Coffein und Theophyllin zur Erreichung therapeutischer Serumkonzentrationen bei der Apnoetherapie.

Eine erste orale Dosis von 6 - 9 mg/kg Theophyllin oder Coffein und eine tägliche Erhaltungsdosis von 5 - 9 mg/kg Theophyllin oder 2-3 mg/kg Coffein ist zu applizieren um rasch wirksame Serumkonzentrationen von etwa 10 µg/ml zu erreichen und aufrechtzuerhalten.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Aranda, J.V., Gorman, W., Bergsteinsson, H., Gunn, T.:
Efficacy of caffeine in treatment of apnea in the low-birth-weight infant.
J. Pediatr., 90, 467-472, 1977.
2. Aranda, J.V., Sitar, D.S., Parsons, W.D., Loughnan, P.M., Neims, A.H.:
Pharmacokinetic aspects of theophylline in premature newborns.
New Engl. J. Med., 295, 413-416, 1976.
3. Avery, M.E., Fletcher, B.D.:
The Lung and its disorders in the newborn, ed 3,
Philadelphia, W.B. Saunders Company, p 57, 1974.
4. Axelrod, J., Reichenthal, J.:
The fate of caffeine in man and a method for its estimation in biological material.
J: Pharmacol. Exp. Ther., 107, 519-523, 1953.
5. Bacola, E., Behrle, F.C., de Schweinitz, L., Miller, H.C., Mira, M.:
Perinatal and environmental factors in late neurogenic sequelae.I. Infants having birth weights under 1,500 grams.
Amer.J.Dis.Child., 112, 359-368, 1966.
6. Beavo, J.A., Roger, N.L., Crofford, O.B., Hardman, J.G., Sutherland, E.W. and Newman, E.V.:
Effects of Xanthine derivates on lipolysis and on adenosine 3' 5'-monophosphate phosphodiesterase activity.
Molec.Pharmac., 6, 597-603, 1970.
7. Bednarek, F.J., Roloff, D.W.:
Treatment of apnea of prematurity with aminophylline.
Pediatrics, 58, 335-339, 1976.
8. Bory, C., Baltassat, P., Porthault, M., Bethenod, M., Frederic, A., Aranda, J.V.:
Metabolism of theophylline to caffeine in premature newborn infants.
J. Pediatr., 94, 988-993, 1979.

9. Christiansen, J.:
Quantitative in situ thin-layer-chromatography of
chinidine and salicylic acid in capillary blood.
J.of Chromatogr., 123, 57-63, 1976.
10. Cook, C.E., Tallent, C.R., Amerson, E.W., Myers, M.W.,
Kepler, J.A., Taylor, G.F., Christensen, H.D.:
Caffeine in plasma and saliva by a radio-immunoassay
procedure.
J.Pharmacol.Exp.Ther., 199, 679-686, 1976.
11. Cornish, H.H., Christman, A.A.:
A study of the metabolism of theobromine, theophylline
and caffeine in man.
J.Biol.Chem., 228, 315-323, 1957.
12. Cottancin, G., Baltassat, P., Bory, C., Challamel, M.-J.,
et Frederich, A.:
Pharmacocinétique de la théophylline chez le nouveau -
né de petit poids de naissance.
Pédiatrie, 32, 677-684, 1977.
13. Danhof, M., Breimer, D.D.:
Therapeutic drug monitoring in saliva.
Clin.Pharmacokinet., 3, 39-57, 1978.
14. Daily, W.J.R., Klaus, M., Meyer, H.B.P.:
Apnea in premature infants: Monitoring, incidence,
heart rate changes and an effect of environmental
temperature.
Pediatrics, 43, 510-518, 1969.
15. Davi, M.J., Sankaran, K., Simons, K.J., Simons, F.R.,
Seshia, M.M., Rigatto, H.:
Physiologic changes induced by theophylline in the
treatment of apnea in preterm infants.
Pediatrics, 92, 91-95, 1978.
16. De Blaey, C.J., De Boer, A.G.:
Kwaliteitsbeheersing van aminofylline zetpillen.
Pharmaceutisch Weekblad, III, 1216-1221, 1976.

17. Dowell, A.R.:
Effect of aminophylline on respiratory sensitivity
in Cheyne-Stoke respiration and in pulmonary emphysema.
New Engl.J.M. 273, 1447-1453, 1965.
18. Eisenberg, W., Holzgraefe, E., Naim, M.:
Frühgeborenen Apnoe. Prophylaxe mit Theophyllin.
Mschr.Kinderheilk., 126, 518-523, 1978.
19. Giacoia, G., Jusko, W.J., Menke, J., Koup, J.R.:
Theophylline pharmacokinetics in premature infants
with apnea.
J.Pediatr., 89, 829-832, 1976.
20. Gubareff, T., de, Sleator, W.Jr.:
Effects of caffeine on mammalian atrial muscle and
its interaction with calcium.
J.Pharmacol.exp.Ther. 148, 202-214, 1965.
21. Horning, M.G., Brown, L., Nowlin, J., Lertratanangkoon, K.,
Kellaway, P., Zion, T.E.:
Use of Saliva in therapeutic drug monitoring.
Clin.Chem., 23, 157-164, 1977.
22. Jenne, J.W., Nagasawa, H.T., Thompson, R.D:
Relationship of urinary metabolites of theophylline
to serum theophylline levels.
Clin.Pharmacol.Ther., 19, 375-381, 1976.
23. Jick, J., Miettinen, O.S., Neff, R.K., Shapiro, S.,
Heinonen, O.P., Slone, D.:
Caffee and myocardial infarction.
N.Engl.J.Med., 289, 63-67, 1973.
24. Kattwinkel, J.:
Neonatal apnea: Pathogenesis and therapy.
J. Pediatr., 90, 342-347, 1977.
25. Klatsky, A.L., Friedman, G.D., Siegelau, A.B.:
Coffee drinking prior to acute myocardial infarction.
Results from the Kaiser-Permanente epidemiologic
study of myocardial infarction.
J.Am.med.Ass., 226, 540-543, 1973.

26. Knop, H.J., Kalafusz, R., Knols, A.J.F., Van der Kleijn, E.:
Preliminary report on the saliva/plasma ratio of theophylline after administration of theophylline derivatives in suppositories.
Pharmaceutisch Weekblad, 110, 1297-1299, 1975.
27. Koppe, J.G., Rietveld, H.J., De Wilde, T.W.:
Apneu-perioden van de prematuur.
T. Zickenverpl. 27, 782- 790, 1974.
28. Koysooko, R., Ellis, E.F., Levy, G.:
Relationship between theophylline concentration in plasma and saliva of man.
Clin.Pharmacol.Ther., 15, 454-460, 1974.
29. Kuschinsky, G., Lüllmann, H.:
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 7, 224-226, 1976.
30. Kuzemko, J.A., Paala, J.:
Apnoeic attacks in the newborn treated with aminophylline.
Arch.Dis.Child. 48, 404 - 406, 1973.
31. Kuzemko, J.A.:
The use of xanthines in treating apnea of prematurity.
Pediatrics, 57, 293, 1976.
32. Loughnan, P.M., Sitar, D.S., Ogilvie, R.L., Eisen, A., Fox, Z., Neims, A.H.:
Pharmacokinetic analysis of the disposition of intravenous theophylline in young children.
J. Pediatr. 88, 874-879, 1976.
33. Morselli, P.L.:
Clinical pharmacokinetics in neonates.
Clin.pharmacokinet. 1, 81-88, 1976.

34. Neims, A.H., Warner, M., Loughnan, P., Aranda, J.V.:
Developmental aspects of the hepatic cytochrome
P-450 monooxygenase system.
Ann.Rev.of Pharmacol. 16, 427-445, 1976.
35. Ogilvie, R.I.:
Clinical pharmacokinetics of theophylline,
Clin. Pharmacokinet., 3, 267-293, 1978.
36. Parsons, W.D., Neims, A.H.:
Effect of smoking on caffeine clearance.
Clin.Pharmacol.Ther., 24, 40-45, 1978.
37. Riechert, M.:
Micromethod for the determination of caffeine and
theophylline allowing direct application of bio-
logical fluids to thin-layer chromatography
plates.
J.Chromatogr., 146, 175-180, 1978.
38. Riechert, M., Lipowsky, G., Stiegler, H.,
Stöckl, H.:
Pharmakokinetik von Coffein und Theophyllin
bei Frühgeborenen mit Apnoen.
Mschr. Kinderheilk. (im Druck) 1980.
39. Richmond, G.H.:
Action of caffeine and aminophylline as respi-
ratory stimulants in man.
J. appl. Physiol., 2, 16-23, 1949.
40. Ritchie, J.M.:
Central nervous stimulants. II. The xanthines,
in Goodman, L.S. and Gilman, A. The pharmacolo-
gical basis of therapeutics, ed 3, London,
Cassell and Collier, Macmillan Pubs., pp 367-
378, 1975.
41. Sant'Ambrogio, G., Mognoni, P., Ventrella, L.:
Plasma levels of caffeine after oral, intramuscular
and intravenous administration.
Arch.int.Pharmacodyn., 150, 259-263, 1964.

42. Shannon, D.C., Gotay, F., Stein, I.M., Rogers, M.C.,
Todres, I.D., Moylan, F.B.M.:
Prevention of apnea and bradycardia in low-birth-
weight infants.
Pediatrics, 55, 589-594, 1975.
43. Thayer, P.S., Himmelfarb, P., Liss, R.H.,
Carlson, B.L.:
Continuous exposure of Hela cells to caffeine.
Mutat.Res., 12, 197-203, 1971.
44. Uauy, R., Shapiro, D.L., Smith, B., Warshaw, J.B.:
Treatment of severe apnea in prematures with orally
administered theophylline.
Pediatrics, 55, 595-598, 1975.
45. Yaffe, S.J., Juchau, M.R.:
Perinatal pharmacology.
Ann.Rev. of Pharmacol. 14, 219-238, 1974.

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung	Seite
<u>1. Allgemeine Pharmakologie der Xanthine</u>	1
1.1. Chemische Struktur der Xanthine	1
1.2. Wirkungen auf das ZNS	2
1.3. Kardiovaskuläres System	2
1.4. Glatte Muskulatur	3
1.5. Einfluß auf die Diurese	3
1.6. Toxikologie	4
<u>2. Wirkung der Xanthinderivate bei Apnoen von Frühgeborenen</u>	5
<u>3. Besonderheiten der Pharmakokinetik bei Frühgeborenen und Reifgeborenen</u>	7
3.1. Plasmaproteinbindung	9
3.2. Halbwertszeit, Clearance und Verteilungsvolumen	9
3.3. Metabolische Elimination	11
3.3.1. Oxidation	11
3.3.2. Glucuronidierung	11
3.4. Nierenfunktion	12
II. Methode	15
<u>1. Material</u>	15
<u>2. Methode der quantitativen Xanthinbestimmung</u>	16
2.1. Probengewinnung	16
2.2. Probenauftragung	17

	Seite
2.3. Chromatographie	18
2.4. Eichkurven	19
2.5. Spektrodensitometrische Messung	20
2.6. Klinische Durchführung der Versuche	21
2.7. Statistische Auswertung und pharmakokinetische Daten	23

III. Ergebnisse 27

1. Quantitative Bestimmung der Xanthine

1.1. Eichkurve	27
1.2. Vorteile der Mikromethode	29
1.3. Spezifität der Methode	29
1.4. Trennung der Xanthinmetaboliten a.d.Urin	31
1.5. Empfindlichkeit der Mikromethode	32

2. Pharmakokinetik der Xanthine 33

2.1. Theophyllin 33

2.1.1. Einfluß des postnatalen Alters auf die Halbwertszeit	36
2.1.2. Verteilungsvolumen	40
2.1.3. Resorption	41
2.1.4. Überwachung der Serumkonzentration	44
2.1.5. Bestimmung der Theophyllinkonzentration im Speichel	44
2.1.6. Ausscheidung von unverändertem Theophyllin im Urin	48

2.2. Coffein 49

2.2.1. Resorption	52
2.2.2. Bestimmung von Coffein im Speichel	55

2.2.3. Ausscheidung von unverändertem Coffein im Urin	55
2.2.4. Kontrolle der Coffeinplasmakonzentration bei Langzeittherapie	57
<u>3. Biotransformation von Theophyllin zu Coffein</u>	60
IV. Diskussion	65
<u>1. Pharmakokinetik der Xanthine</u>	66
1.1. Resorption der Xanthine	66
1.2. Speichelkonzentration der Xanthine	68
1.3. Halbwertszeit, Clearance und Dosierung	69
1.3.1. Theophyllin	69
Dosierung von Theophyllin	71
1.3.2. Coffein	73
Dosierung von Coffein	75
<u>2. Biotransormation von Theophyllin zu Coffein</u>	76
V. Zusammenfassung	78
VI. Literatur	81

Lebenslauf

Ich wurde im August 1949 in Lindau als Sohn des Schlossers Ernst Stiegler und der Hausfrau Elisabeth Stiegler geboren.

Als zweitältester Sohn einer siebenköpfigen Familie besuchte ich von 1956 bis 1963 die Volksschule, von 1963 - 1967 die staatliche Mittelschule in Lindau und wechselte nach Erlangung der Mittleren Reife in das Bodenseegymnasium Lindau über.

Nach dem Abitur 1971, einem sechsmonatigen Krankenhauspraktikum und dem 15 monatigem Grundwehrdienst begann ich 1973 zwei Semester Tiermedizin zu studieren und konnte im Wintersemester 1974 bereits im 3. Semester Humanmedizin weiterstudieren.

Im April 1976, 1977 und 1979 bestand ich die ärztliche Vorprüfung, das erste und zweite Staatsexamen.

Nach Absolvierung des Praktischen Jahres in den Fächern Innere Medizin, Chirurgie und Anaesthesie schloß ich mein Medizinstudium im April 1980 erfolgreich ab.

